N° E\277

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Marie-Renée CHEVALLIER

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'étude de l'action mutagène du peroxyde succinique chez Escherichia Coli

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 27 Avril 1964 devant la Commission d'Examen :

MM. Ch. SADRON — *Président*

L. HIRTH
J.P. EBEL
R. LATARJET — *Examinateurs*

N° E 277

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Marie-Renée CHEVALLIER

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'étude de l'action mutagène du peroxyde succinique chez Escherichia Coli

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 27 Avril devant la Commission d'Examen :

MM. Ch. SADRON — *Président*

L. HIRTH
J.P. EBEL
R. LATARJET
} *Examinateurs*

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG – FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

Professeur G. MILLOT

Doyens honoraires

MM. A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE, J.H. VIVIEN.

Professeurs honoraires

MM. P. de BEAUCHAMP, L. BOISSELET, L. BOUNOURE, H. CARTAN, G. CERF, Cl. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, H. GAULT, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICH NEROWICZ, L. NEEL, H. OLLIVIER, Ch. SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.

Maître de conférences honoraires

R. WEILL

Professeurs

MM.	G. HUGUEL	T.	Chimie du Pétrole
	H.J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
	A. ROUSSEL	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
	H. FORESTIER	T.	Chimie générale
	J. ROTHE	T.	Physique du Globe
	P. LACROUTE	T.	Astronomie
	J.H. VIVIEN	T.	Zoologie et embryologie expérimentale
	A. MAILLARD	T.	Physicochimie du pétrole
	S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
	L. SACKMANN	TTP	Mécanique des Fluides
	J. BYE	T.	Chimie minérale et Chimie physique
	R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mlle	PEREY M.	T.	Chimie nucléaire
MM.	Ph. PLUVINAGE	T.	Physique expérimentale
	S. GODLSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
	P. JOLY	T.	Biologie générale
	H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
	P. CUER	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
	G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
	R. LECOLAZET	TTP	Physique du Globe
	H. SAUCIER	TTP	Minéralogie
	R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mlle	GILLET S.	TTP	Paléontologie
Mlle	GAGNIEU A.	TTP	Botanique
MM.	S. NIKITINE	T.	Physique générale
	F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
	B. WURTZ	TTP	Chimie biologique
	J. BRENET	T.	Electrochimie
	G. DURISSON	TTP	Chimie
	Cl. LEVI	TTP	Biologie générale
	A. COCHE	TTP	Physique nucléaire
	R. CERF	T.	Physique générale
	M. BERGER	TTP	Mathématiques
MM.	J. FRENKEL	TTP	Mathématiques
	P. TAGLANG	T.	Physique
	J.P. LONCHAMP	TTP	Physique
	J. BOSCHER	PSC	Mécanique des Fluides
	A. DELUZARCHE	TTP	Chimie
	J.B. DONNET	TTP	Chimie physique
	R. ARMBRUSTER	TTP	Physique
	A. ROCHE	TTP	Physique du Globe
	L. HIRTH	T.	Microbiologie
	J. YOCCOZ	T.	Physique Théorique
	A. SIGOT	PSC	Zoologie
	J. COGNE	TTP	Géologie
	A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
	A. GALLMANN	PSC	Physique
	P. MIALHE	TTP	Physiologie animale
	J.P. EBEL	T.	Chimie biologique
	J. PARROD	TTP	Chimie
	R. WEY	TTP	Chimie
Mme	MAGNAC D.	TTP	Physique
MM.	M. DAUNE	PSC	Physique
	J.P. ADLOFF	PSC	Chimie nucléaire
	J. LEVISALLES	TTP	Chimie
	D. BERNARD	TTP	Méthodes Mathématiques de la Physique
	G. LAPRAZ	PSC	Botanique
	M. ZISMAN	TTP	Mathématiques
	E. DANIEL	PSC	Physique
	P. CHEVALLIER	PSC	Physique
	J. GREMILLARD	TTP	Mathématiques
	P. CARTIER	T.	Mathématiques M.P.C.
	G. REEB	T.	Topologie
	R. BARJON	TTP	Physique
	F. NORGUET	T.	Analyse supérieure
	R. CHAUVIN	T.	Psychophysiologie

Professeur associé

MM.	J. SAMPSON	Mathématiques

Maîtres de Conférences

MM.	J. WUCHER	Physique
Mme	BRINI M.	Chimie
MM.	G. PERNEY	Physique
	R. BARO	Physique
	H. DANAN	Physique
	J. LERAY	Physique
	H. DURANTON	Botanique
	R. WEISS	Chimie
	J.P. SCHWING	Chimie
	M. SIESKIND	Physique
	G. MONSONEEDO	Physique Mathématique
	P. GABRIEL	Mathématiques
	A. CLAUSS	Chimie
Mme	WINTER C.	Physique
MM.	P.A. MEYER	Mathématiques
	G. WEILL	Physique
	M. COURTILLOT	Mathématiques appliquées
	J.P. EBERH A RT	Minéralogie
	R. OMNES	Physique théorique

Secrétaire

G. SAINT PE

UNIV. LEIDEN BIBL.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

1ere PARTIE - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTION MUTAGENE SPECIFIQUE DES PEROXYDES ORGANIQUES

INTRODUCTION 9

CHAPITRE 1 - MATERIEL ET METHODES 11

Matériel - 1. Souches bactériennes 11
2. Milieux de cultures 11
3. Agents mutagènes 12

Méthodes - 1. Méthodes bactériologiques 13
2. Analyse statistique des résultats 15
3. Techniques d'analyse biochimiques 16
4. Techniques particulières à H. Influenzae 17

CHAPITRE 2 - ETUDE DE L'ACTION LETALE DES PEROXYDES ORGANIQUES SUR E. Coli 19

Propriétés chimiques des peroxydes 19
Etude de l'action létale des peroxydes sur B et B/r 22
Etude de l'action létale des peroxydes sur E. Coli 15 T^{-913} 25
Discussion 33
Résumé et conclusion 34

CHAPITRE 3 - ACTION MUTAGENE SPECIFIQUE DES PEROXYDES ORGANIQUES 35

I - La détection des mutants induits 35
II - Signification des résultats 36
III - Mutations étudiées 38

1. Mutation de résistance au phage T_1 38
2. Mutation de résistance à la Sm 40
3. Mutation réverse Try^+ 41
4. Mutation réverse Pro^+ 44
Discussion 48
Résumé et conclusion 50

Pages

2ème PARTIE - RECHERCHE DU MECANISME DE L'ACTION MUTAGENE DU PEROXYDE SUCCINIQUE

INTRODUCTION 51

CHAPITRE IV - ACTION DU PEROXYDE SUCCINIQUE SUR L'ADN D'HEMOPHILUS INFLUENZAE IN VIVO 53

Technique 53
Résultats expérimentaux 54
Discussion 56
Résumé et conclusion 58

CHAPITRE V - LE ROLE DES PRECURSEURS DES ACIDES NUCLEIQUES DANS LA MUTAGENESE INDUITE PAR LE PEROXYDE SUCCINIQUE 59

1. Effet d'une préincubation en présence des précurseurs des acides nucléiques sur la fréquence des mutants induits par le peroxyde succinique 60
2. Effet d'une incubation en présence des 4 désoxynucléosides, après un traitement par le peroxyde succinique, sur l'activité létale et mutagène de ce dernier 63
3. Action du peroxyde succinique sur le pool nucléotidique des bactéries 65
4. Isolement des dérivés de peroxydation des précurseurs de l'ADN préparés in vitro 66
5. Etude de l'action mutagène de ces dérivés 72

Discussion 76
Résumé et conclusion 78

CHAPITRE VI - INFLUENCE DES CONDITIONS METABOLIQUES SUR LA MUTAGENESE 79

1. Mutation Pro$^+$ - Peroxyde succinique - Rayons UV 80
2. Mutation Try$^+$ - " " " " 83

Discussion 85
Résumé et conclusion 87

CHAPITRE VI - ANALYSE DES CAPACITES BIOSYNTHETIQUES DES BACTERIES TRAITEES PAR LE PEROXYDE SUCCINIQUE 89

1. Comportement des bactéries traitées par le peroxyde succinique puis resuspendues dans un milieu minimum 89
2. Comportement des bactéries traitées par le peroxyde succinique puis resuspendues dans différents milieux 93

a. Effet de l'addition d'HC 93
b. Effet de l'addition d'HC + CM 93

Discussion 94
Résumé et conclusion 98

Résumé et conclusions générales 99

A la mémoire de mon Père

A ma Mère

A mon Mari.

A Monsieur Charles SADRON

A Monsieur Henri BENOIT

A Madame Denise LUZZATI

Ce travail a été effectué au Centre de Recherches sur les Macromolécules où M. le Professeur Charles SADRON, Directeur de ce laboratoire a bien voulu me réserver un bienveillant accueil. Qu'il trouve ici les marques de ma profonde et respectueuse gratitude.

Je tiens ensuite à exprimer ma vive reconnaissance à Mme Denise LUZZATI, chargée de Recherches au C.N.R.S. qui a guidé mon travail et m'a sans cesse encouragée et aidée par l'excellence de ses conseils.

Mlle M-L GRETH, Mme B. WERLE et M. P. LE PANSE m'ont apporté une collaboration efficace dans la réalisation de nombreuses expériences, je les en remercie chaleureusement.

Enfin je remercie tous les camarades du C.R.M. qui m'ont aidée, de près ou de loin, dans la réalisation de ce travail.

Première Partie

MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTION MUTAGÈNE SPÉCIFIQUE DES PEROXYDES ORGANIQUES

INTRODUCTION

Les mutations spontanées sont relativement rares, aussi les généticiens cherchèrent à produire expérimentalement des mutations afin, précisément, de pouvoir étudier le mécanisme de leur apparition et utiliser des mutants de types variés pour établir les cartes génétiques.

C'est en 1926 que H.J. MULLER a obtenu pour la première fois de façon unéquivoque des mutations induites par irradiation chez la drosophile. Les radiations ionisantes (rayons X, α, β) furent alors employées fréquemment et exclusivement pour produire des mutations jusqu'à la découverte en 1942 par C. AUERBACH et J. ROBSON, de l'action mutagène de substances chimiques appartenant à la catégorie des "moutardes". L'étude de l'action mutagène de ces substances avait d'ailleurs été entreprise en raison de leur analogie d'action avec celle des rayons X. Par la suite, l'action mutagène de nombreuses substances chimiques fut essayée et de très nombreux dérivés plus ou moins complexes se révélèrent être des agents capables d'induire des mutations, des cassures et des remaniements chromosomiques chez les plantes.

Dès 1946, RAPOPORT mit en évidence l'action mutagène de l'éthylène imine, puis en 1948, il découvrit l'action mutagène de la formaldéhyde sur la drosophile. En 1946, STONE, WYSS et HAAS ont montré que l'irradiation préalable du milieu de culture de Staphylococcus Aureus avait un effet mutagène net sur ces bactéries. Continuant leurs travaux, ils montrèrent que cet effet était dû à la formation, lors de l'irradiation, de peroxydes organiques (O. WYSS, W.S. STONE, et J.B. CLARK, 1947 ; O. WYSS, J.B. CLARK, F. HAAS et W.S. STONE, 1948 ; O. WYSS, J.B. CLARK, F. HAAS, W.S. STONE, 1950 ; DICKEY, CLELAND et LOTZ, 1949). Utilisant des peroxydes organiques déterminés et de l'eau oxygénée, ils mirent en évidence l'action mutagène de ces corps sur Neurospora. En 1951, DEMEREC, BERTANI et FLINT ont étudié l'action mutagène sur les bactéries de 31 substances parmi lesquelles 19 se trouvaient avoir une action mutagène nette sur le caractère étudié. Citons l'acide borique (le seul des 4 acides minéraux testé) l'eau oxygénée, des sels de métaux divalents tels que SO_4Cu et surtout Cl_2Mn, la formaldéhyde déjà utilisée par RAPOPORT et AUERBACH, certains phénols, des carbamates, l'acriflavine, la caféïne.

Ainsi, en 1956, lorsque nous avons commencé notre travail, l'existence d'agents mutagènes très variés se trouvait démontrée. Toutefois, le mode d'action de la plupart de ces agents était fort mal connu, leur action directe sur l'ADN peu évidente : il semblait donc particulièrement intéressant à ce moment d'étudier l'action de certains d'entre eux sur plusieurs sites de mutations d'un même génome et de déterminer s'ils étaient susceptibles de manifester une action mutagène spécifique en rapport avec une modification spécifique des bases de l'ADN.

Dans ce but, nous avons choisi d'étudier l'action mutagène de peroxydes organiques dont on savait que certains d'entre eux ont une action sur l'ADN et dont l'étude présente un intérêt supplémentaire du fait de leur intervention éventuelle lors de l'action biologique des radiations.

Nous avons donc tout d'abord cherché à mettre en évidence une action mutagène sur E. Coli de 3 peroxydes organiques : le peracide succinique, le peroxyde de cumène et le peroxyde de thymine. (L'étude de l'action mutagène de ces peroxydes n'avait pas encore été abordée). Ayant mis en évidence une action mutagène spécifique de ces trois peroxydes, nous avons tenté de préciser par quel mécanisme le peroxyde succinique pouvait être mutagène. Les résultats que nous avons obtenus et que nous allons décrire nous ont amenés à proposer un modèle du mécanisme de l'action mutagène de ce peroxyde.

CHAPITRE I

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MATERIEL

1/ Souches bactériennes

Nous avons utilisé au cours de ce travail plusieurs souches d'Eschericia Coli :

- E. Coli B,

- E. Coli B/r, mutant radiorésistant de B sélectionné par irradiation ultraviolette de E. Coli B.

- E. Coli 15 T^- Pro^- Try^- (mutant double de E. Coli 15 T^-). E. Coli 15 T^- est un mutant obtenu à partir de E. Coli 15, il exige de la Thymine pour sa croissance. Il a été isolé et étudié par S. COHEN et H.D. BARNER (1954). La souche dont nous nous sommes servi a été isolée au C.R.M. à partir de E. Coli 15 T^-. C'est une souche portant, en plus de la mutation entraînant une dépendance vis-à-vis de la Tymine, deux mutations obtenues indépendamment par irradiation U.V. et qui l'ont rendue tryptophane, dépendante et proline dépendante (E. Coli 15 T^- 913).

Certaines expériences ont été réalisées avec la souche d'Hemophilus Influenzae Rd, qui est une souche sensible à tous les antibiotiques, et Hemophilus Influenzae Rd/Sr, souche résistante à la streptomycine, isolée à partir de la souche sensible Rd.

2/ Milieux de culture

a) Milieux liquides

Nous avons cultivé les bactéries, soit en milieu complexe, (Bouillon nutritif Difco 8 g/litre) soit en milieu synthétique minimum de composition suivante :

$(NH_4)_2So_4$	1 g,
$K_2H\ PO_4$	7 g,
KH_2PO_4	3 g,
$MgSO_4$	0,1 g,

Citrate de Na 0,05 g pour 1 litre d'eau distillée. (DAVIS et MINGIOLI, 1950).

Cette solution (appelée milieu D) est stérilisée à l'autoclave. On ajoute ensuite du glucose à la concentration finale de 1 % et selon les cas de la thymine, à la concentration finale de 10^{-4}M, du tryptophane et de la proline à la concentration de 50 µg/ml.

b) Milieux solides

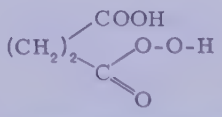
- Gélose nutritive : Bouillon Difco 8 g
  Agar Agar Difco 15 g pour 1 litre de milieu.
- Gélose molle : Bouillon Difco 8 g
  Agar Agar Difco 8 g pour 1 litre de milieu.
- Gélose synthétique :

On stérilise à l'autoclave une solution de milieu D à la concentration double de celle indiquée plus haut. Pour préparer 1 litre de milieu gélosé on mélange 500 ml de cette solution à 500 ml de gélose également stérilisée : la concentration finale d'agar-agar est de 15 g/litre. On ajoute ensuite le glucose à la concentration finale de 1 % et les facteurs de croissance : Thymine 10^{-4}M, Proline et Tryptophane 20 µg/ml (conc. finale).

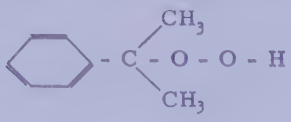
3 - Agents mutagènes

Pour induire des mutations nous avons utilisé :

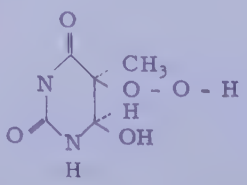
1/ du peroxyde succinique synthétisé au laboratoire par H. SCHWEITZ



2/ du peroxyde de cumène (Rhône-Poulenc)



3/ du peroxyde de thymine(*)



4/ le rayonnement ultra-violet : nous avons utilisé une lampe germicide Philips émettant la plus grande partie de son énergie à 2537 Å. L'énergie incidente sur le plan d'irradiation est mesurée à l'aide d'un dosimètre de LATARJET, (LATARJET et coll. 1953).

(*) Nous remercions le Dr. Ekert qui a eu l'amabilité de nous fournir un échantillon de ce peroxyde préparé par ses soins, ainsi que le premier échantillon de peroxyde succinique que nous avons utilisé.

II - METHODES

1 - Méthodes bactériologiques

a) Méthodes de culture

Les cultures stock de bactéries sont conservées sur de la gélose inclinée à + 4° et repiquée tous les 2 mois. A partir des tubes de gélose inclinée, on prépare des cultures en bouillon que l'on conserve à 4° pendant un mois et à partir desquelles on prélève les bactéries pour ensemencer les subcultures. Les subcultures sont faites en bouillon dans le cas de E. Coli B : on ensemence le bouillon de façon à avoir 100 bact/ml. On laisse incuber pendant 18 h à 37° avec agitation. Après ce temps d'incubation, la culture a atteint la phase stationnaire (4.10^9 bactéries/ml environ). Dans le cas d'E. Coli 15 T^-913 les subcultures sont faites en milieu D supplémenté avec de la thymine, du tryptophane et de la proline. On laisse incuber ensuite jusqu'à avoir 5.10^8 bact/ml. A ce stade, les bactéries sont encore en phase exponentielle.

b) Traitement des bactéries par les agents mutagènes

Les bactéries, destinées au traitement par un agent mutagène, sont centrifugées, lavées deux fois avec du sérum physiologique et remises en suspension dans du milieu D (sans glucose, ni facteurs de croissance). On ajoute à cette suspension l'agent utilisé à la concentration voulue. Cette suspension bactérienne est ensuite incubée à 37° C avec agitation (agitateur rotatif 50 tours/min.) pendant un temps donné. On interrompt l'action du peroxyde soit par une dilution au 1/100 lorsqu'il ne s'agit que de déterminer la viabilité, soit par refroidissement à 4° et centrifugation à froid lorsqu'on se propose de déterminer simultanément la viabilité et les mutations induites. On incube toujours parallèlement dans les mêmes conditions, à l'agent mutagène près, des suspensions de bactéries témoins.

Dans le cas d'irradiation ultraviolette, les bactéries lavées une fois en sérum physiologique sont remises en suspension en milieu D sans suppléments. On place 7 ml de la suspension à irradier dans une boîte de Petri, de façon à avoir une épaisseur de liquide de 1 mm. On agite la boîte manuellement pendant l'irradiation.

c) Détection des mutants induits

Mutants résistant au phage T_1 (T_1R)

Nous avons étudié seulement les mutations dites "end-point" (DEMEREC et LATARJET, 1946), c'est-à-dire que nous avons laissé les bactéries effectuer un nombre suffisant de divisions sur les boîtes pour que toutes les mutations soient exprimées avant de les soumettre à l'action de l'agent sélectif, en l'occurence une suspension de phages T_1.

On procède de la manière suivante : on incube parallèlement deux séries de boîtes de Petri contenant les bactéries traitées :

a) une série de boîtes contenant les bactéries coulées dans 3 ml de gélose molle à 8 ‰. C'est sur ces boîtes que sera effectuée la sélection des mutants résistants aux phages. On incube ces boîtes à 37° jusqu'à ce que la population bactérienne ait effectué environ 10 divisions. On coule ensuite sur ces boîtes une deuxième couche de 3 ml de gélose molle contenant une

suspension de phages T_1 à la concentration convenable. (environ 1 phage/bactérie). On laisse les boîtes pendant 1 h à la température ambiante pour permettre aux phages de diffuser dans la gélose molle, puis on les place à 37° pendant 48 h. Pendant cette incubation, en présence des phages, les bactéries sensibles ont été lysées alors que les bactéries résistantes aux phages se sont multipliées donnant naissance à des colonies visibles que l'on peut compter.

b) l'autre série de boîtes est destinée à servir à la détermination approximative du nombre de divisions effectuées par la population bactérienne au moment où on ajoute les phages. Les bactéries ne sont pas coulées dans de la gélose molle mais simplement étalées à la surface des boîtes. Après des durées d'incubation variables, on recueille les bactéries présentes sur les boîtes en lavant celles-ci avec du sérum physiologique. On détermine ensuite soit par numération des bactéries viables, soit par turbidimétrie, le nombre de bactéries présentes dans la suspension ainsi obtenue. On peut alors calculer le nombre de bactéries présentes sur les boîtes au moment du lavage. Ceci permet : 1° - de calculer la concentration des phages à mettre en suspension dans la gélose molle que l'on étalera par dessus la couche contenant les bactéries dans les boîtes de la première série et - 2° - d'estimer le nombre de divisions effectuées par la population depuis le début de l'incubation. Toutefois, cette détermination n'est qu'approximative, car les conditions de croissance sur les deux séries de boîtes sont quelque peu différentes, les bactéries coulées dans la gélose molle ayant une croissance légèrement ralentie par rapport à celle des bactéries étalées. On tend donc à surestimer le nombre de bactéries présentes sur les boîtes au moment où on ajoute l'agent de sélection, toutefois, on ne peut éviter ce procédé.

Mutants résistant à la streptomycine (SmR)

Après le traitement, 10^6 bactéries sont étalées sur des boîtes de Petri contenant 20 ml de gélose nutritive. On les laisse pousser à la température du laboratoire, le temps nécessaire pour permettre aux bactéries d'effectuer 10 à 12 divisions (16 heures environ). On refroidit alors les boîtes pendant 2 heures à 4°, puis on coule sur une partie de celles-ci 4 ml de gélose molle contenant 600 µg de streptomycine par ml.(*) L'autre partie des boîtes est utilisée comme précédemment pour la détermination du nombre de bactéries présentes sur les boîtes au moment où on ajoute l'antibiotique. Les boîtes contenant la streptomycine sont laissées pendant 2 h à la température du laboratoire pour permettre la diffusion de la streptomycine dans la gélose puis incubées à 37° pendant 72 heures. On compte ensuite les colonies de bactéries résistantes à la streptomycine apparues sur les boîtes. Cette technique est similaire à celle utilisée par DEMEREC (1951) et RUBIN (1954).

(*) Nous avons essayé au cours des expériences de recherches de mutants S_mR, d'éviter de mélanger les bactéries à de la gélose molle et nous les avons simplement étalées ; le refroidissement des boîtes avant l'ajonction de streptomycine est suffisant pour empêcher la dispersion des microcolonies lorsqu'on verse la gélose molle. Dans ce cas, l'estimation du nombre de divisions résiduelles effectuées par les bactéries que l'on soumet à l'action sélective de la streptomycine n'est pas biaisée, car cette estimation se fait à partir de boîtes où les bactéries se multiplient dans des conditions identiques.

Mutants Pro^+ (c.à.d. n'exigeant plus de proline pour leur croissance)

On étale les bactéries traitées sur de la gélose synthétique contenant seulement de la thymine (10^{-4} M) et du tryptophane (20 µg/ml). Après 36 heures d'incubation à 37°, on compte les colonies apparues sur les boîtes. Il y a une croissance résiduelle sur les boîtes même en l'absence de proline : les mutants induits que l'on observe ne sont donc pas des mutants "immédiats". (Cf. chap. III)

Mutants Try^+ (c.à.d. n'exigeant plus de tryptophane pour leur croissance)

On étale les bactéries d'une part sur de la gélose synthétique contenant de la thymine (10^{-4} M) de la proline (20 µg/ml) et d'autre part sur de la gélose contenant en outre une faible quantité de tryptophane (0,1 µg/ml) ceci parce qu'il n'y a pas de croissance résiduelle des bactéries tryptophane déficientes sur les boîtes ne contenant pas de tryptophane.

2 - Analyse statistique des résultats

Lorsqu'il s'agit de l'estimation du nombre des mutants induits nous donnons les nombres moyens de mutants par boîte.

$$\bar{X} = \sum X/n$$

X étant le nombre de colonies par boîte, et n étant le nombre de boîtes. Dans le cas de la détection des mutants Pro^+, n est compris entre 5 et 10 alors que dans le cas de la détection des mutants Try^+, n est compris entre 8 et 15. On fait suivre la moyenne de l'erreur type de la moyenne s_m ;

$$s_m = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

s étant l'écart type :

$$s = \sqrt{\frac{(\bar{X} - X)^2}{n - 1}}$$

Dans certains cas nous avons comparé les moyennes en utilisant le test t de Student-Fisher. FISHER a montré que si deux populations sont identiques (hypothèse nulle) la différence entre les moyennes des deux séries de mesures $d = \bar{X}_a - \bar{X}_b$ rapportée à l'écart type de la différence, se distribuait autour de zéro suivant la distribution de t, c.à.d. que

$$t = \frac{d}{s_d}$$

s_d, l'écart type estimé de la différence, se calcule en combinant les sommes des carrés des écarts par rapport à la moyenne, obtenues dans les deux séries de mesures de la manière suivante :

soit n_a le nombre de mesures faites pour déterminer $\bar{X}_a$

soit n_b " " " " " $\bar{X}_b$

On a :

$$S_d = \sqrt{\frac{S_a^2}{n_a} + \frac{S_b^2}{n_b}} = S\sqrt{\frac{n_a + n_a}{n_b + n_b}} = \sqrt{\frac{(X_a - \bar{X}_a)^2 + (X_b - \bar{X}_b)^2}{n_a + n_b - 2}} \cdot \frac{n_a + n_b}{n_a \cdot n_b}$$

On calcule t et on cherche dans les tables à double entrée la probabilité d'obtenir la valeur de t que l'on a calculée dans le cas de l'hypothèse nulle. Si cette probabilité est inférieure à 5 %, on considère que l'hypothèse nulle n'est pas valable, c.à.d. que les deux populations diffèrent quant aux moyennes testées. Lorsque nous avons calculé t et trouvé une valeur significative nous indiquons cette valeur et la valeur correspondant à une probabilité de 5 % que nous considérons comme le seuil de signification.

3 - Techniques d'analyses biochimiques

Nous avons utilisé pour fractionner les constituants des bactéries, la méthode de SCHNEIDER (1945) en omettant la délipidation qui ne semble pas être indispensable dans le cas de E. Coli.

Le schéma du fractionnement est le suivant :

Les culots de centrifugation des bactéries sont traités au PCA 0,5 N 20 min. à 4° puis centrifugés

surnageant = acido-soluble

(TCA = acide trichloracétique)
(PCA = acide perchlorique)

Précipité acido-insoluble
extraction TCA 100° 2 × 20 min.
ou PCA 70° 2 × 20 min.

surnageant : extrait PCA chaud = ARN + ADN

Précipité résiduel = protéines.

- l'acido-soluble :

Les culots des bactéries sont traités par de l'acide perchlorique froid 0,5 N. On laisse en contact à la chambre froide pendant 30 min., puis on centrifuge pendant 20 min. à 10000 t/min. et à froid. On recueille soigneusement le surnageant de centrifugation pour mesurer son absorption à 260 mμ. La composition de cette fraction a été assez peu étudiée, néanmoins les quelques travaux publiés indiquent que sa composition est variable. Cette fraction contient vraisemblablement la majeure partie des cations inorganiques et la majeure partie des composés intermédiaires du métabolisme. Ces composés sont essentiellement des acides aminés (a.a.) et des nucléotides. (D.B. GOLDSTEIN et A. BROWN, 1960). La teneur en a.a. semble plus variable que la teneur en nucléotides, mais la variété des composés phosphorylés de type nucléotidique y est grande et un certain nombre d'entre eux n'ont pas encore été identifiés. (ROBERTS et coll., 1957 ; D.B. GOLDSTEIN et A. BROWN ; 1960 ; FRANZEN et S.B. BINKLEY, 1961). La mesure de l'absorption UV à 260 m, reflète la teneur de cette fraction en composés de type nucléotidique, et permet d'apprécier l'importance du "pool" nucléotidique des cellules et de suivre ses variations quantitatives.

- précipité acido-insoluble :

Le précipité restant est extrait par 2 ml de PCA 0,5 N deux fois 20 min. à 70° (DE DEKKEN GRENSON M. et DE DEKKEN, 1959). Sur des parties aliquotes de l'extrait perchlorique à chaud, on dose ensuite : 1° l'ADN par la méthode de DISCHE (voir Nucleic acids, vol. I, Acad. Press, 1954) ou la méthode de CERIOTTI (1955) lorsqu'on ne dispose que de quantités faibles de précipité. - 2° le phosphore par la méthode de MARTIN-DOTY (1949) connaissant la teneur en ADN et en phosphore total on peut calculer la teneur en RNA. Toutefois, cette détermination n'est qu'approximative puisqu'on considère arbitrairement tout le phosphore restant comme étant du phosphore de l'ARN. Or, selon ROBERTS et coll., 15 % du phosphore total de E. coli est du phosphore lipidique (ROBERTS et coll. 1957) qui peut se trouver dans cette fraction puisque nous n'avons pas pratiqué de délipidation préalable.

- Dosage de l'azote protéique :

Sur culot résiduel de l'extraction perchlorique à 70°, on dose l'azote par Microkjehldal. L'azote ainsi dosé est essentiellement de l'azote protéique (ROBERTS et coll. 1957).

- Dosage des peroxydes :

1° Dosage du pouvoir oxydant total par iodométrie

On dose le pouvoir oxydant sur une solution d'IK : après avoir acidifié la solution à titrer par SO_4H_2 4N et fait barboter du CO_2, on ajoute la solution d'IK, ensuite on dilue le mélange de manière à être en milieu 0,5 N et on titre l'iode libéré par $S_2O_3Na_2$ N/200 en présence d'empois d'amidon au moment du virage.

2° Dosage des peroxydes organiques

Le dosage se fait en deux étapes :

a) Sur une partie aliquote de la solution à doser, on détermine le pouvoir oxydant total.

b) On dose ensuite l'eau oxygénée sur une autre partie de la solution. Pour cela on fait réagir le sulfate cérique et l'eau oxygénée en milieu acide en présence de ferroïne. Par différence entre le pouvoir oxydant total et le pouvoir oxydant dû à l'eau oxygénée présente, on calcule le pouvoir oxydant correspondant au peroxyde organique.

4 - Techniques particulières à H. Influenzae

a) Milieux

1) Milieu de LEVINTHAL (Milieu L)

Brain-Heart Infusion Difco 35 g dans 900 ml
Sang de mouton défibriné 100 ml

Le sang est ajouté au milieu bouillant qui est ensuite filtré et stérilisé.

2) Milieu LE

On ajoute 3 volumes "d'Eugon broth" à 1 vol. de milieu Levinthal (mélangé stérilement)

3) Milieu LEA

On mélange stérilement 1 vol. de milieu L à 1 vol. de milieu gélosé de composition suivante :

Gélose	25 g
Bactotryptone	20 g
ClNa	5 g
Beef extract	6 g pour 1 000 ml d'eau distillée.

On ajoute les antibiotiques choisis, en l'occurence de la streptomycine (25 µg/ml).

b) Techniques de transformation

1/ Bactéries précompétentes

Les bactéries (souche Rd) sont cultivées en milieu LE avec une bonne aération (par agitation mécanique). Leur temps de division dans ces conditions est de 30 min. On prélève les bactéries en cours de phase exponentielle, (10^9 bact/ml) et on poursuit l'incubation sans agitation, et en condition d'aérobiose réduite (2 ml de culture dans un tube à hémolyse) pendant 90 min. A ce moment, on ajoute du glycérol (concentration finale 10 %) à la culture et on congèle immédiatement à - 70°.

2/ Transformation

On dégèle les bactéries précompétentes, on les dilue au 1/10 dans le milieu de transformation (ClNa 0,15 M, tampon phosphate pH7/M/100) auquel on ajoute l'ADN dont on veut déterminer l'activité transformante. Après 30 min. d'incubation à 37° sans agitation, du mélange bactéries + ADN, on dilue au 1/10 dans le milieu d'expression (LE).

3/ Expression phénotypique des bactéries transformées

Les bactéries transformées qui ont été diluées au 1/10e dans le milieu LE sont incubées à 37° pendant 90 min. afin de permettre aux bactéries qui ont absorbé l'ADN exogène de l'intégrer dans leur génome et surtout pour permettre l'expression phénotypique du caractère acquis après l'intégration.

4/ Détermination du nombre de bactéries transformées

On refroidit à 0° les tubes de milieu LE contenant les bactéries transformées, et on étale 0,1 ml d'une dilution adéquate (environ 100 bactéries transformées/boîte) sur des boîtes de milieu LEA streptomyciné. Les colonies sont dénombrées après 18 à 24 h d'incubation à 37°.

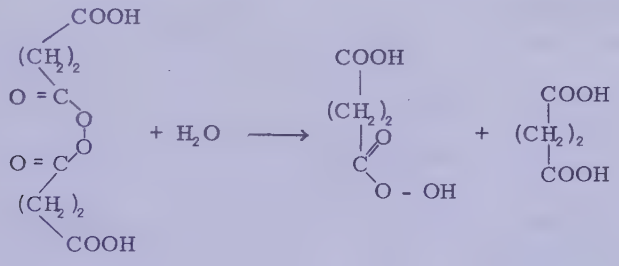
CHAPITRE II

ÉTUDE DE L'ACTION LETALE DES PEROXYDES ORGANIQUES SUR E. COLI

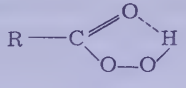
Avant d'aborder l'étude de l'action létale des peroxydes sur E. Coli, nous décrirons brièvement les propriétés chimiques de ces peroxydes en solution dans l'eau.

1 - Peroxyde succinique

Le peroxyde succinique est en réalité un peracide. Sa formation par hydrolyse du disuccinoyperoxyde a lieu dès la dissolution de celui-ci dans l'eau :



L'intérêt de l'étude des peracides est dû à la particularité de leur structure ; il y a dissymétrie de part et d'autre du groupe -O-O- et la possibilité de formation d'un pont hydrogène intramoléculaire donne à l'hydrogène la possibilité de migrer d'un atome d'oxygène à l'autre pendant les réac-



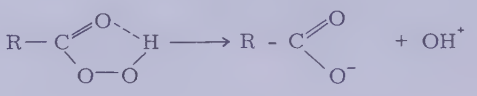
tions éventuelles. Les peracides ont de ce fait, une fonction peroxydique exaltée et réagissent en tant que donneur d'oxygène sur les substrats les plus variés : oléfine, amines, nitriles, cétones et autres.

Le peracide succinique en solution dans de l'eau se décompose en donnant de l'acide succinique avec libération d'oxygène et formation d'H_2O_2.

Nous avons mesuré la diminution du pouvoir oxydant total de solution aqueuse de peroxyde succinique à différents pH. la vitesse avec laquelle le

pouvoir oxydant diminue dépend du pH. Ceci indique que le peroxyde succinique dans ces conditions se décompose essentiellement suivant un mode hétérolytique.

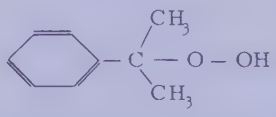
Le mécanisme de ce type de décomposition, en particulier dans les solvants ionisés est mal connu. On peut toutefois le schématiser formellement de la façon suivante :



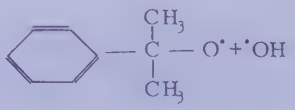
Il se formerait donc un ion OH^+. On sait peu de choses sur la durée de vie de cet ion dont l'existence n'a jamais été prouvée. Il aurait une tendance marquée à fixer son oxygène sur les doubles liaisons et serait ainsi responsable de la fonction donneur d'oxygène des peracides. Réagissant sur OH^-, il serait susceptible de former de l'eau oxygénée dont on observe effectivement la formation lors de la décomposition du peroxyde succinique en solution aqueuse. Il serait en somme responsable de la réactivité importante du peracide succinique comparée à celle de l'eau oxygénée.

2 - Peroxyde de cumène

Le peroxyde de cumène est un hydroperoxyde de formule suivante :



Dans les solvants organiques, il se décompose de manière homolytique en donnant des radicaux :

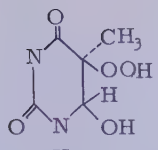


qui sont capables d'initier un certain nombre de réactions. En milieu fortement acide, il est capable de subir également une décomposition hétérolytique. En milieu aqueux, la décomposition du cumène est essentiellement homolytique. Elle peut être induite par des ions de métaux divalents tels que les ions Co^{++}, les ions Mn^{++}, les ions Fe^{++}.

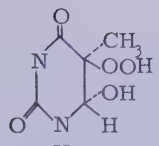
Les impuretés métalliques et l'environnement sont donc susceptibles d'avoir une influence prépondérante sur la réactivité du peroxyde de cumène.

3 - Peroxyde de thymine

L'intérêt de l'étude de ce produit provient du fait qu'il a été obtenu par irradiation aux rayons X de la thymine. Sa structure a été établie par EKERT (1957). Il peut exister sous deux formes cis et trans (I et II).



I



II

Ces composés ne sont pas décomposés par la catalase.

D'après SCHOLES et WEISS, (1960), la réactivité de ce peroxyde sur les iodures est beaucoup plus forte que celle de l'eau oxygénée : alors que la constante de réaction de l'hydroperoxyde de thymine en solution avec de l'iodure est de 1,59 $mole^{-1}$ sec^{-1} (à pH 4,0, 25° C) celle de l'eau oxygénée dans les mêmes conditions n'est que de 1,13. 10^{-2} $mole^{-1}$ sec^{-1}. Il est également beaucoup plus réactif que le peroxyde de cumène qui ne réagit que très lentement à froid avec IK. Cette constation confère un intérêt supplémentaire à l'étude de ce peroxyde dont le mécanisme de décomposition n'est cependant pas connu.

Nous avons vu, que l'on a envisagé l'intervention des peroxydes organiques lors de l'action des radiations sur les systèmes biologiques (voir en particulier Peroxydes organiques en radiobiologie, MASSON ed. 1958). Aussi nous a-t-il paru intéressant de comparer les survies vis-à-vis du peroxyde succinique de 2 souches de Coli dont l'une E. Coli B/r présente la particularité d'être résistante aux radiations et à un certain nombre de composés dits radiomimétiques (moutarde à l'azote en particulier). D'autre part l'étude de l'action létale des différents peroxydes est un préliminaire indispensable à l'étude de leur action mutagène. Nous avons donc d'une part comparé l'effet de l'un de ces peroxyde et des rayons U.V. sur la viabilité de E. Coli B et E. Coli B/r, et étudié l'effet létal des différents peroxydes utilisés sur E. Coli B et E. Coli 15 T - 913.

I - ETUDE DE L'ACTION LETALE DE PEROXYDES SUR B ET B/R

1/ Action létale du peroxyde succinique et des rayons UV sur B et B/r :

Les résultats obtenus en traitant pendant 30 min. par du peroxyde succinique à différentes concentrations, E. Coli B et E. Coli B/r récoltés en phase stationnaire sont représentés sur la figure II-1. La survie de ces deux souches après irradiation ultra-violette est représentée fig. II-2.

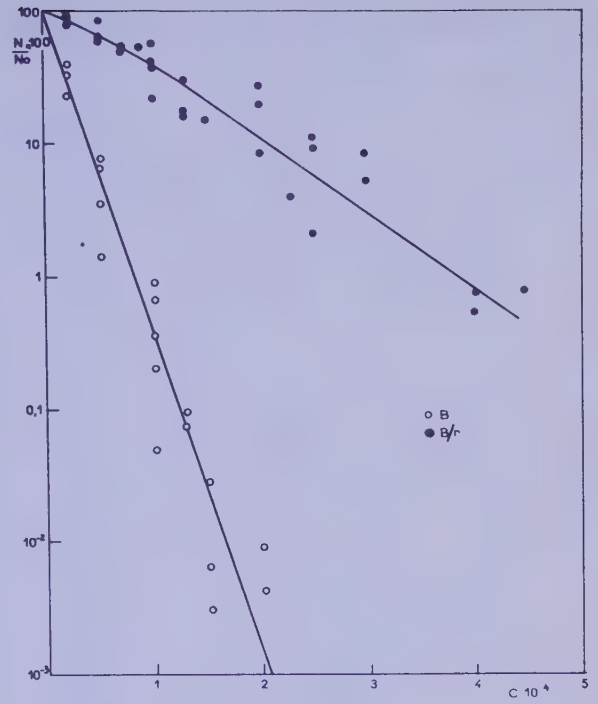
Dans le cas de E. Coli B, le nombre de bactéries viables décroît exponentiellement aussi bien après l'action du peroxyde succinique qu'après irradiation ultra-violette, alors que les courbes représentant la survie(*) de E. Coli B/r ont une allure sigmoïde dans le cas de l'irradiation ultraviolette et exponentielle dans le cas du traitement par le peroxyde succinique, ce que l'on observe également après action des rayons X sur cette même souche (V. BRYSON, 1948). Si on compare la sensibilité des deux souches au peroxyde succinique et aux radiations, on constate que B/r est plus résistant que B non seulement aux radiations, mais également au peroxyde succinique. B/r est également plus résistant que B à l'action des moutardes à l'azote (V. BRYSON, 1948).

2/ Action du peroxyde de Cumène sur E. Coli B

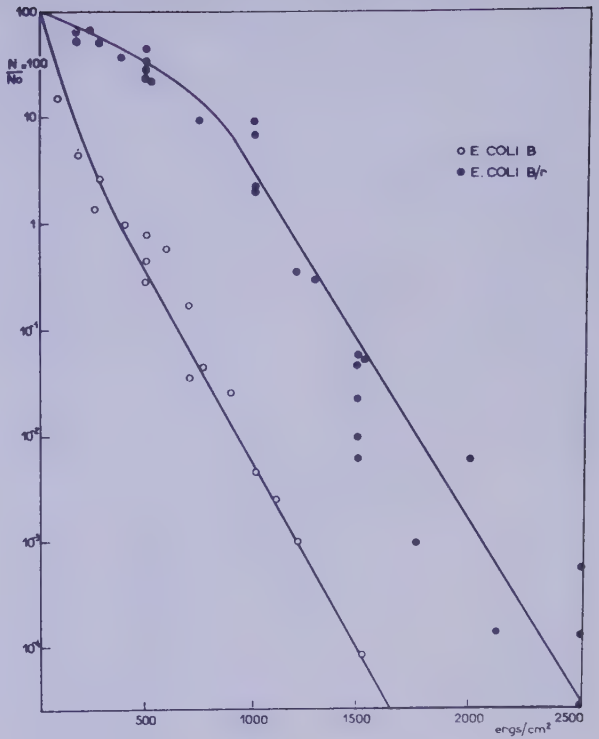
Les courbes de survies de E. Coli B après action du peroxyde de Cumène établies dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'étude de l'action du peroxyde succinique et des UV sont toutefois différentes. La courbe de survie des bactéries après une incubation de 30 min. en présence

---

(*) On exprime la survie des bactéries par le rapport entre le nombre N des bactéries viables déterminées après traitement et le nombre N_o de bactéries non traitées soit $= \frac{N}{N_o}$

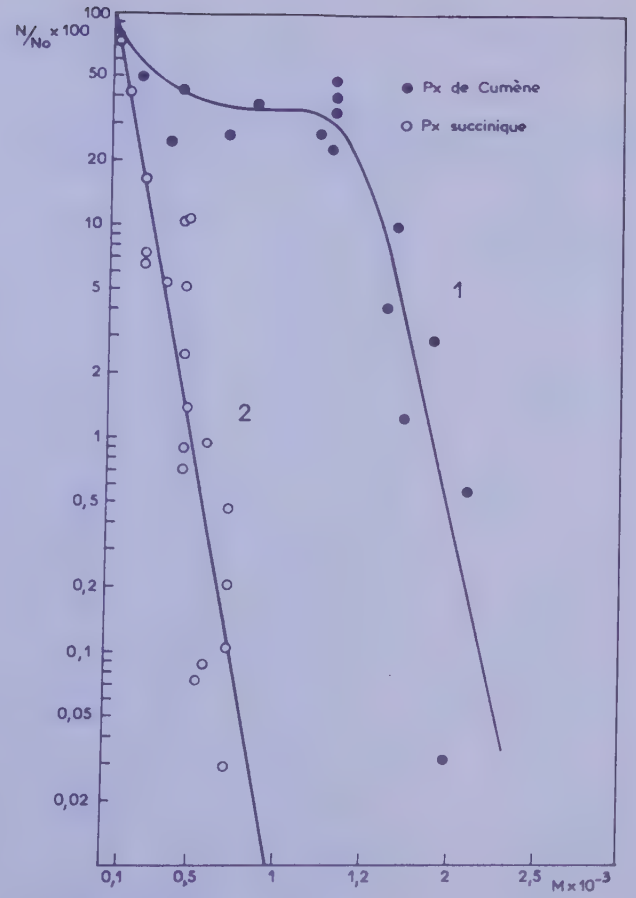


Action létale du peroxyde succinique sur E. Coli B et Br, en fonction de la concentration en peroxyde Durée du traitement : 30 min.

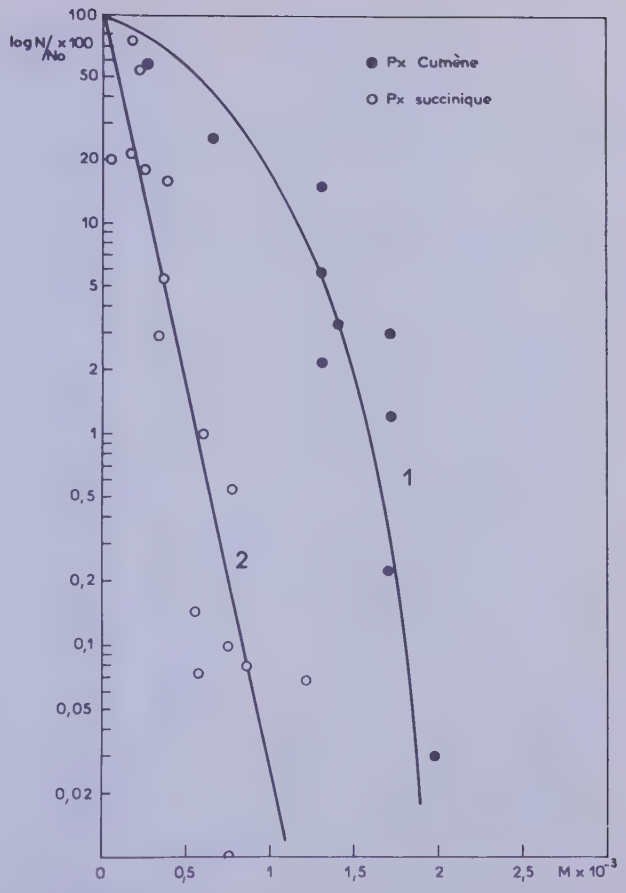


Action des rayons U.V. sur E. Coli B et Br.

Figure II-1



Action létale du peroxyde de cumène et du peroxyde succinique sur E. Coli B en fonction de la concentration en peroxyde. Durée du traitement : 30 min.



Action létale du peroxyde de cumène et du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-913}, en fonction de la concentration en peroxyde. Durée du traitement : 30 min.

Figure II-2

de peroxyde de Cumène à des concentrations variables présente deux points d'inflexion dont la signification est obscure (fig. II-2). Au contraire, si on étudie la survie en fonction du temps d'action pour une concentration donnée de peroxyde on obtient une courbe sigmoïde classique (fig. II-3).

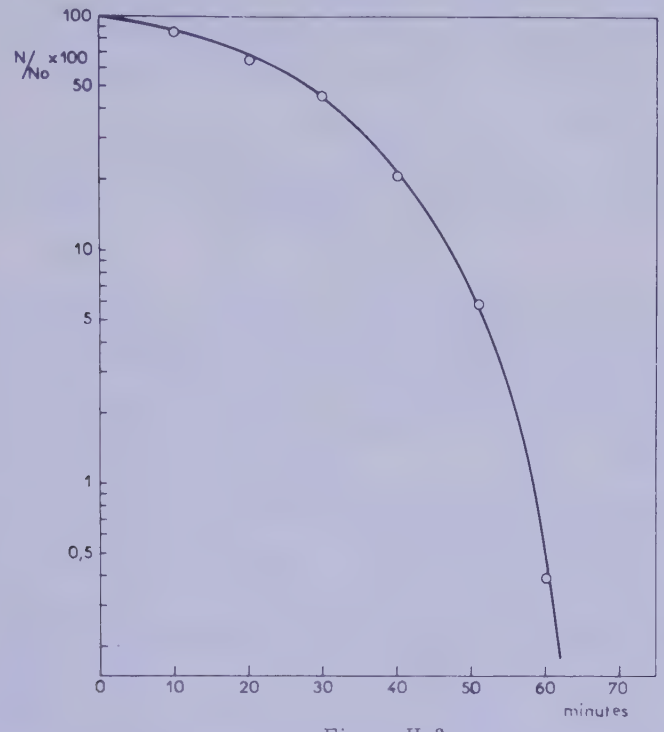


Figure II-3

Action létale du peroxyde de cumène sur B''resting''en fonction de la durée du traitement. Concentration de peroxyde de cumène 5.10^{4} g/ml soit $1,32.10^{-2}$M.

Nous avons vérifié que le Cumène aux concentrations que nous avons utilisées n'a pas d'action létale par lui-même : c'est bien l'introduction de la fonction hydroperoxyde qui est responsable de l'action toxique du produit.

L'étude de la croissance en bouillon des bactéries survivant au traitement par le peroxyde succinique et le peroxyde de Cumène montre toutefois une différence importante : les bactéries traitées par le peroxyde succinique recommencent immédiatement à se multiplier lorsqu'on les resuspend en bouillon, après avoir éliminé le peroxyde par centrifugation, au contraire les bactéries traitées par le peroxyde de Cumène présentent des temps de latence considérables avant de recommencer à se diviser.

II - ACTION LETALE DE DIFFERENTS PEROXYDES SUR 15 T⁻ 913

1/Peroxyde succinique

Les conditions expérimentales diffèrent de celles utilisées avec les souches d'E. Coli B et E. Coli B/r. On fait agir le peroxyde succinique sur des bactéries cultivées en milieu minimum et prélevées pendant la phase de croissance exponentielle.

Les courbes de survie que l'on obtient soit en fonction du temps de traitement, pour une même concentration de peroxyde, soit en fonction de

la concentration en peroxyde pour un temps de traitement donné ne sont pas très reproductibles (alors qu'avec E. Coli B et E. Coli B/r prélevé en phase stationnaire les résultats étaient reproductibles). D'une expérience à l'autre on observe des variations de survies de l'ordre de 10 à 50 ; (voir fig. II-2). Nous avons tenté de déterminer les causes de cette variabilité.

a) Variations liées à la méthode de mesure

Si on traite des parties aliquotes d'une suspension bactérienne, par des parties aliquotes d'une solution de peroxyde pendant le même temps, on obtient les résultats qui figurent sur le tableau 1.

TABLEAU 1

Détermination de la survie de bactéries traitées par le peroxyde succinique: on a traité des parties aliquotes d'une suspension bactérienne par des parties aliquotes d'une solution de peroxyde succinique.

	N° du prélèvement	Bact. viables/ml x 10		Survie $N/N_0 \times 100$
		Bactéries traitées	Bactéries témoins	
Exp. I(*)	1	176 ± 31	71 ± 2,2	45 ± 9,2
	2	144 ± 17,8	72 ± 9,7	36,4 ± 9,2
	3	120 ± 21,8	71 ± 3,8	30,7 ± 9,2
				M = 37,4
Exp. II	1	123 ± 10	482 ± 12	25,6 ± 3
	2	124 ± 16		25,8 ± 4,1
	3	94 ± 4		19,6 ± 1,3
	4	108 ± 11		22,5 ± 2,9
				$\bar{M}$ = 23,37

Concentration de peroxyde succinique 10^{-4} g/ml. Durée du traitement 30 min. on fait suivre les moyennes des numérations de bactéries de l'erreur standard $s/\sqrt{n}$.

En traitant des parties aliquotes d'une même culture par des solutions de peroxydes préparées indépendamment les unes des autres mais dont la concentration est la même aux erreurs de pesées et de volume près, on obtient les résultats qui figurent dans le tableau 2.

Ces résultats indiquent les limites de la précision des mesures : l'écart extrême est de 50 %. La précision n'est donc pas très grande, néanmoins les variations constatées d'une expérience à l'autre dépassent très largement les erreurs de mesure.

b) Autres sources de variations

Nous avons alors recherché à déterminer quels pouvaient être le ou les paramètres contrôlables responsables des variations observées. Dans ce

(*) Dans cette expérience les bactéries traitées ont été concentrées 5,3 x par rapport au témoin avant d'être étalées.

TABLEAU 2

	Bact. viables/ml × 10^{-5}	Survie $N/N_a \times 100$	Ecart par rapport à la moyenne
Témoin	13,5 ±		
sol. I	20,8 ± 5,3	18 %	6,8
II	24,5 ± 6,2	21,2	3,6
III	40,5 ± 7,4	35,2	10,6
$\bar{m}$	= 28,6 $\bar{m}$	= 24,8	

Détermination de la survie de bactéries traitées par le peroxyde succinique : on a traité des parties aliquotes d'une même suspension bactérienne par des solutions de peroxyde de même concentration mais préparées indépendamment les unes des autres (solutions I, II et III) conc. de peroxyde 10^{-4} g/ml durée du traitement 30 min.

but, nous avons étudié l'action d'une concentration de peroxyde sur des parties aliquotes d'une même culture : 1) en fonction de la concentration des bactéries pendant le traitement, 2) en fonction du nombre de lavages de la culture avant le traitement, 3) en fonction du degré d'aération pendant et après le traitement par le peroxyde. Nous avons pu constater que l'effet létal du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-9}[13] ne varie guère avec la concentration des bactéries (du moins entre 10^7 et 5.10^8 bactéries/ml). Par ailleurs, les lavages de bactéries avec du sérum physiologique susceptibles de faire varier la composition du "pool" intracellulaire, n'affectent la survie des bactéries que si on répète cette opération plus de trois fois : nous avons donc régulièrement soumis les bactéries à deux lavages avant le traitement par le peroxyde. Par contre, le degré d'aération pendant le traitement influence de façon très nette la survie (tableau 3). Cependant, malgré l'utilisation de conditions stan-

TABLEAU 3

Influence de l'aération sur l'effet létal du peroxyde succinique

15 ml d'une suspension de bactéries sont mis	Survie après 30 min. en présence de peroxyde 10^{-4} g/ml
1) dans 1 erlenmeyer de 250 ml de contenance totale	0,16 %
2) dans 1 tube à essai de 15 mm de diamètre contenance totale 25 ml	5,0 %
Ces deux échantillons sont agités vigoureusement 1) sur un agitateur rotatif 150 t/min., et 2) sur un agitateur à va-et-vient.	

dard d'aération nous avons continué à observer des différences importantes, d'une expérience à l'autre, de l'effet létal d'une même concentration de peroxyde sur E. Coli 15 T^{-913}. Nous en avons alors recherché les causes dans des variations de l'état physiologique des bactéries.

Nous avons tout d'abord examiné les répercussions, sur la survie des bactéries, du degré de complétion d'un cycle de réplication de l'ADN bactérien en utilisant la technique de MALØE et HANAWALT (1961). Nous n'avons pas constaté de différence de survie entre les bactéries ayant terminé un cycle de réplication de l'ADN (fig. II-4 bactéries préincubées en DTG) et les bactéries dont l'ADN est en cours de réplication (fig. II- 4 bactéries non préincubées).

Par contre, nous avons observé des variations importantes de survie en fonction du temps de culture des bactéries (tableau 4 et fig. II-5) sans cependant pouvoir mettre ces variations en rapport ni avec des variations quantitatives des différents constituants cellulaires que nous avons dosé (tableau 4), ni avec des phases déterminées de la culture. Il semble qu'il

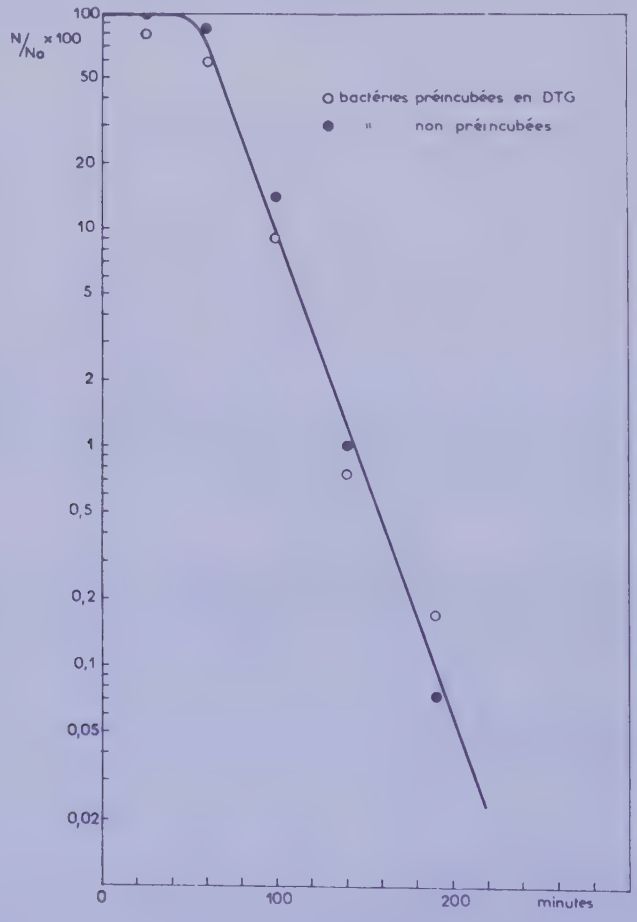


Figure II-4

Action du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-913} en fonction de la durée du traitement. Concentration de peroxyde 10^{-4}g/ml = $4,3.10^{-4}$M.

TABLEAU 4

Sensibilité de E. Coli 15 T^{-913} à l'action létale du peroxyde succinique à différents temps de culture.

N° de prélèv.	Temps de culture	DO	Nb. de divisions par rap. à t_o	Survie en %	µg d'ADN p.10 DO de cult.	µg d'ARN p. 10 DO de cult.	g de N protéique p.10 DO de cult.	Extrait acide soluble DO à 260 mµ p.10 DO de cult. (mesuré à 650 m)
-	0	0,01						
1	120'	0,03	1,6	0,43	122	430	350	5,2
2	190'	0,12	3,8	11,9	133	340	260	6,0
3	230	0,27	4,9	0,02	111	280	246	6,2
4	440	0,85	6,6	45,0	144	300	314	7,3
5	1040	1,15	6,8	2,0	182	270	314	10,5

Les différents prélèvements de bactéries sont centrifugés, lavés 2 fois en sérum physiologique puis remis en suspension en tampon Davis de manière à avoir la même D.O. dans les différents prélèvements (0,2). Des parties aliquotes de ces suspensions sont traitées par le peroxyde succinique 10^{-4} g/ml pendant 30 min., puis on les centrifuge, les resuspend en tampon Davis et on fait la numération à partir de ces suspensions de bactéries viables. Sur des parties aliquotes de bactéries témoins, on pratique les différentes analyses biochimiques mentionnées. (DO = densité optique).

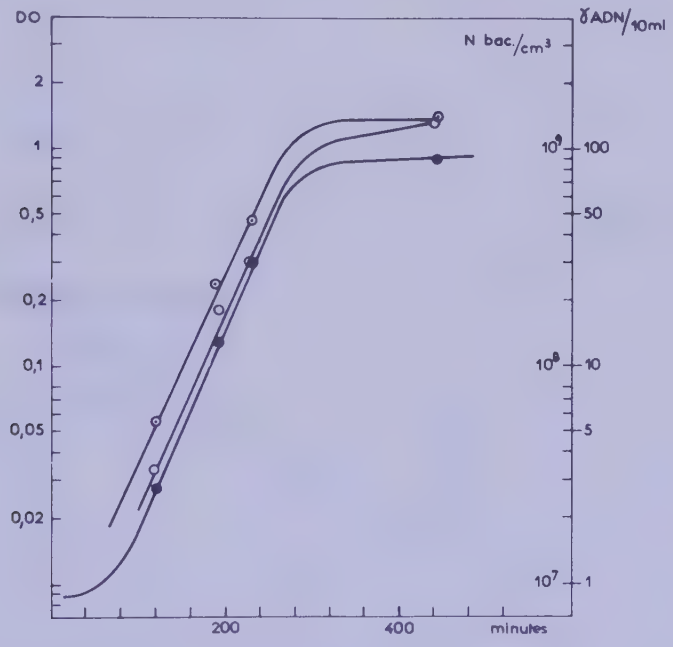


Figure II-5

Nombre de bactéries viables/ml de culture
ADN/ml de culture
DO de la culture à 650 mµ

Croissance de E. Coli 15 T^{-913} en milieu minimum contenant les supléments essentiels. Les points représentés sur la figure sont ceux auquels on a fait des prélèvements de parties aliquotes de la culture sur lesquels on a pratiqué les différents dosages, indiqués dans le texte, et dont on a déterminé la sensibilité à l'action létale du peroxyde succinique.

s'agisse de variations cycliques de sensibilité au peroxyde qui pourraient être en rapport avec des variations cycliques de la perméabilité au peroxyde de la membrane bactérienne.

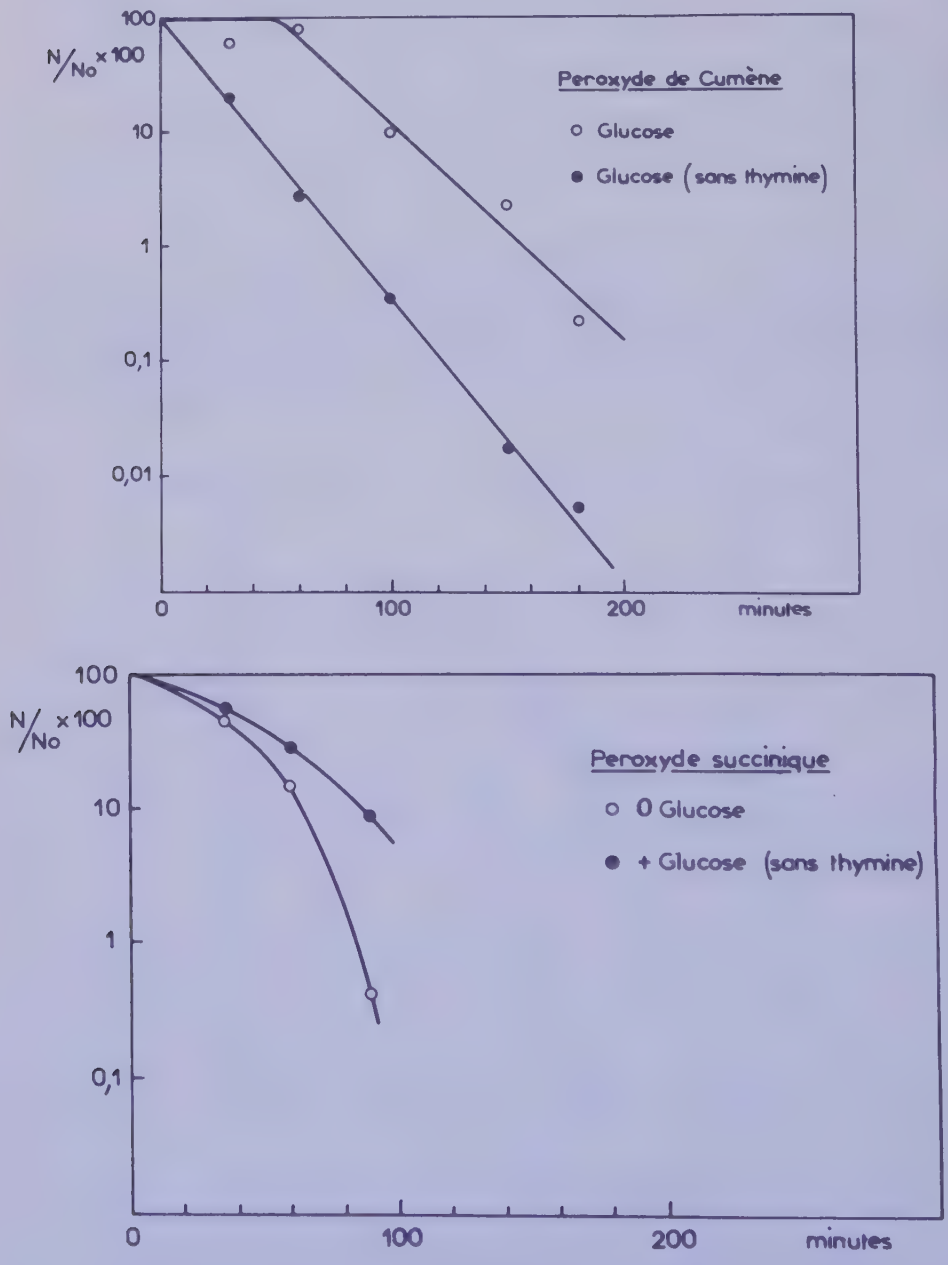


Figure II-6

Action létale du peroxyde de cumène et du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-913} en présence et en absence de glucose pendant le traitement par le peroxyde. Concentration de peroxyde 10^{-4} g/ml dans les deux cas.

2/ Peroxyde de cumène

Utilisé dans les mêmes conditions que le peroxyde succinique (bactérie en phase de croissance exponentielle, même milieu réactionnel), on observe également une grande variabilité de son action létale d'une expérience à l'autre.

Nous avons observé que la présence de glucose (1 %) dans le milieu de traitement accentue notablement l'effet létal du peroxyde de Cumène alors que l'action létale du peroxyde succinique (fig. II-6) est au contraire un peu plus faible en présence de glucose qu'en son absence.

Cet effet "sensibilisant" du glucose a été retrouvé au cours de nombreuses expériences.

3/ Peroxyde de Thymine

Nous n'avons étudié son action létale que très succinctement. L'action létale de ce peroxyde se manifeste à une concentration molaire supérieure à celle du peroxyde succinique et du peroxyde de Cumène (fig. II-7).

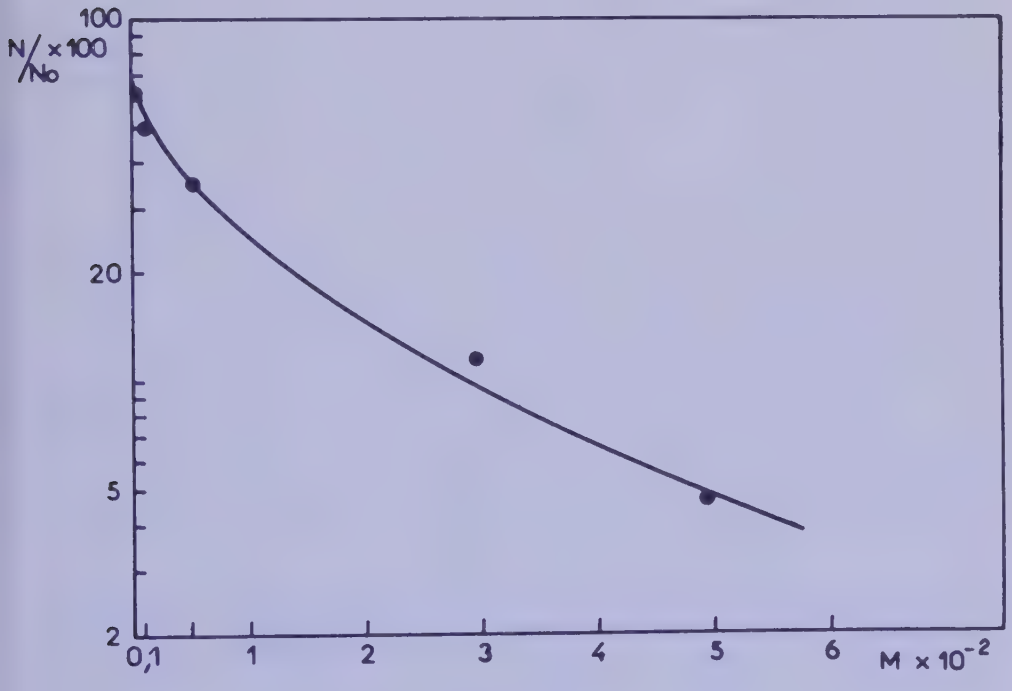


Figure II-7

Action létale du peroxyde de thymine sur E. Coli 15 T^{-913} en fonction de la concentration en peroxyde. Durée du traitement 30 min.

4/ Comparaison entre l'activité des trois peroxydes et celle d'eau oxygénée

Pour comparer l'action létale du peroxyde succinique et du peroxyde de Cumène, nous avons groupé sur la figure II-2 les survies obtenues avec ces 2 différents peroxydes. La comparaison de l'action létale du peroxyde succinique et du peroxyde de Cumène sur E. Coli B en phase stationnaire (fig. II-2) montre que le peroxyde succinique est plus actif que le peroxyde de Cumène à concentration moléculaire équivalente. La comparaison de leur action sur E. Coli 15 T^{-913} (fig. II-2) montré que l'ordre des réactivités reste le même, toutefois les différences entre l'action létale du peroxyde succinique et du peroxyde de cumène sont plus faibles dans le cas de E. Coli B.

L'action létale du peroxyde de thymine a lieu dans un domaine de concentration plus de 10 fois supérieur à celui pour lequel le peroxyde succinique et le peroxyde de Cumène manifestent la leur, et qui est également supérieur à celui de l'eau oxygénée (fig. II-8).

L'ordre des pouvoirs inactivant des peroxydes cités est donc en allant du plus actif au moins actif, peroxyde succinique, peroxyde de cumène, eau oxygénée, peroxyde de thymine.

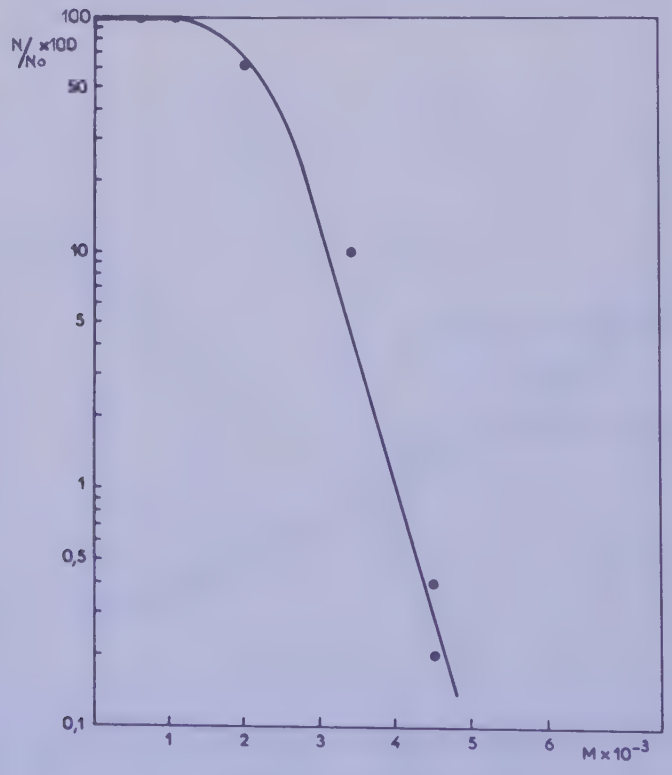


Figure II-8

Action létale d'H_2O_2 sur E. Coli 15 T^{-913} en fonction de la concentration en H_2O_2, durée du traitement 30 min.

DISCUSSION

1) Nous avons comparé l'action létale du peroxyde succinique et de l'irradiation ultra-violette sur deux souches de Coli : E. Coli B et E. Coli B/r qui est une souche résistante aux radiations dérivée de E. Coli B. BRYSON a montré que la souche B/r résistante aux radiations était en outre résistante à certains agents alkylants (BRYSON, 1948), nous avons montré qu'elle était également beaucoup plus résistante à l'action létale du peroxyde succinique que E. Coli B. (LUZZATI et CHEVALLIER, 1957). Le mécanisme de la radiorésistance de B/r est loin d'être connu. Cependant, les premières hypothèses qui attribuaient la résistance de B/r soit à une quantité plus grande d'ADN, soit à un nombre moyen de noyaux par cellule plus élevé que E. Coli B ont dû être abandonnées. D'une part, HILL et SIMPSON, (1963) ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre le nombre de noyaux par cellules et la sensibilité à l'irradiation, d'autre part, GILLIES et ALPER (1960), HILL et SIMPSON (1961) ont établi que le contenu en ADN et ARN de B et B/r est identique. Ces mêmes auteurs ont montré que les différences de résistances aux radiations dépendaient de différences métaboliques puisqu'on peut modifier les réponses des différentes souches en changeant la composition du milieu de croissance des bactéries après l'irradiation. Les différences entre ces souches reflèteraient des changements dans les processus métaboliques permettant la réparation des lésions produites après l'irradiation, et ces changements auraient pour origine des mutations à différents sites, conférant soit une radio-résistance accrue, soit une sensibilité accrue. Le fait qu'une même mutation puisse conférer simultanément une résistance accrue à l'effet létal des radiations et de certaines substances chimiques indique qu'il y a certains processus métaboliques communs qui peuvent aboutir à la réparation des lésions provoquées par ces divers agents. Ceci amène à supposer que si ces lésions ne sont pas identiques, elles doivent avoir un élément commun qui pourrait bien être leur localisation sur une même macromolécule, en particulier l'ADN. On sait d'ailleurs que les radiations, RX et rayons U.V. (SCHOLES et coll., 1956, 1960, LATARJET et coll., 1961, 1963), les agents alkylants (P.D. LAWLEY, 1961, a,b) ont une action sur l'ADN tant in vivo que in vitro. Le peroxyde succinique a une action sur l'ADN in vitro (LATARJET, 1956, LATARJET et REBEYROTTE, 1958, LUZZATI, SCHWEITZ, BACH et CHEVALLIER 1961). La relative résistance au peroxyde succinique de la souche d'Escherichia Coli B/r par rapport à la souche d'E. Coli B pourrait bien impliquer une action directe de ce peroxyde sur l'ADN in vivo.

2) Les différences de comportement des bactéries vis-à-vis du peroxyde succinique et du peroxyde de Cumène ne sont pas surprenantes étant donné les différences de réactivité de ces agents in vitro. Dans le cas du traitement des bactéries par le peroxyde de Cumène, on constate

a) l'existence d'un "effet sensibilisant" du glucose qui est à l'opposé de celui que l'on observe lors de l'action du peroxyde succinique. UPDEGRAFF et BOVEY (1958) qui ont mesuré la vitesse de décomposition des différents peroxydes organiques par différentes espèces de bactéries ont montré que E. Coli était capable de décomposer activement le peroxyde de cumène ; ils ont montré également que l'addition aux suspensions bactériennes de glucose et de certains autres carbohydrates était susceptible d'accélérer notablement la décomposition de ce peroxyde, et ceci par un effet non catalytique. Etant donné le rôle sensibilisant du glucose on peut penser qu'une

décomposition accélérée du peroxyde en augmente l'action létale. Ceci serait également en accord avec l'observation de LATARJET (1956) qui a constaté l'action sensibilisatrice à l'action létale du peroxyde de cumène d'un prétraitement du phage T_4 par l'acide ascorbique : en effet, l'acide ascorbique est également susceptible de provoquer efficacement la décomposition du peroxyde de cumène, (UPDEGRAF et BOVEY (1958)).

b) On constate en deuxième lieu qu'après l'action du peroxyde de cumène sur E. Coli B, les bactéries traitées, cultivées en milieu nutritif présentent un temps de latence qui peut être assez considérable, alors que dans les mêmes conditions les bactéries traitées par le peroxyde succinique ne montrent pas de latence.

3) La comparaison entre l'action létale du peroxyde de cumène et du peroxyde de thymine est également intéressante, car, bien que ces peroxydes soient tous les deux des hydroperoxydes, leur action létale se manifeste à des concentrations très différentes, de l'ordre de 10^{-3} M pour le peroxyde de cumène, et de l'ordre de 10^{-2} M pour le peroxyde de thymine.

Les différences entre peroxydes sont donc nettes et indiquent qu'il doit y avoir des mécanismes d'action assez distincts lorsqu'on traite les bactéries par ces agents. Il est intéressant de remarquer que les actions des peroxydes "in vitro" sont également bien différentes : le peroxyde succinique inactive le principe transformant d'Hemophilus Influenzae (LUZZATI D., SCHWEITZ H., BACH M.-L., et CHEVALLIER M.-R., 1961) et celui du Pneumocoque (LATARJET R., 1956) alors que le peroxyde de cumène n'a pas d'action inactivantes sur ces deux sortes d'ADN. L'eau oxygénée a une action inactivante in vitro mais elle est qualitativement différente de celle du peroxyde succinique et bien moins importante (LATARJET et REBEYROTTE, 1958)). Nous montrerons par la suite que l'action mutagène de ces peroxydes est également très différente.

RESUME ET CONCLUSIONS

Nous avons étudié et comparé l'action létale du peroxyde succinique et des rayons U.V. sur E. Coli B et B/r. Cette étude a permis de montrer que E. Coli B/r, qui est plus résistant que E. Coli B à l'action des radiations est également plus résistant que E. Coli B à l'action du peroxyde succinique.

Nous avons ensuite comparé l'action létale du peroxyde succinique et du peroxyde de cumène sur E. Coli B ; nous avons pu constater que les courbes de survie ont une allure très différente et que le peroxyde de cumène est beaucoup moins actif que le peroxyde succinique.

Puis nous avons étudié l'action létale de ces deux peroxydes, celle du peroxyde de thymine et de l'eau oxygénée sur E. Coli 15 T^{-913} en phase de croissance exponentielle ; nous avons montré que leur activité létale est, en allant du plus actif au moins actif :

peroxyde succinique
peroxyde de cumène
eau oxygénée
peroxyde de thymine.

CHAPITRE III

ACTION MUTAGÈNE SPÉCIFIQUE DES PEROXYDES ORGANIQUES

Une comparaison préliminaire de l'action mutagène du peroxyde succinique et des rayons U.V. sur deux sites de mutations de E. Coli B (mutation vers la résistance à la streptomycine et mutation vers la résistance au phage T_1) ayant montré une action mutagène spécifique du peroxyde succinique, nous avons étendu cette étude à un plus grand nombre de sites de mutations sur lesquels nous avons étudié l'action mutagène de différents peroxydes organiques.

Avant d'aborder la description des résultats que nous avons obtenus lors de cette étude, nous allons décrire et discuter les méthodes de détection des mutants induits.

I - LA DETECTION DES MUTANTS INDUITS

La détection des mutants bactériens se fait généralement sur des milieux sélectifs de façon à ce que les bactéries non mutées pour le caractère étudié ne puissent s'y développer tandis que les bactéries mutées pour ce caractère peuvent s'y multiplier et former une colonie visible.

Cependant l'établissement d'un génotype et d'un phénotype muté n'est généralement pas un phénomène instantané. C'est ainsi que DEMEREC et LATARJET (1956) ont montré que lors de l'induction par irradiation U.V. de mutants résistants au phage T_1, le délai d'apparition des mutants pouvait aller jusqu'à 11 générations : ce temps est beaucoup plus long que celui auquel on aurait pu s'attendre dans le cas d'un simple délai d'expression phénotypique. Par la suite, lors de l'étude de l'induction de mutants reverses, DEMEREC et CAHN (1953) ont établi l'existence d'une corrélation entre le nombre de mutants induits et l'importance de la croissance résiduelle effectué par les bactéries sur le milieu de sélection auquel ils ajoutaient des quantités variables de bouillon nutritif permettant ainsi une croissance limitée des bactéries déficientes. Ils en avaient conclu, que, comme lors de l'induction par irradiation U.V. de mutants résistants au phage T_1, il y avait également un long délai d'apparition des mutants réverses induits.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène (DEMEREC, 1946). Le délai dans l'apparition des mutants pourrait être, 1) soit d'origine génotypique : un certain temps de latence étant nécessaire entre l'action du mutagène et l'établissement de la mutation ; 2) soit d'origine phénotypique : ce délai d'expression phénotypique pourrait être très long, il pourrait en outre être précédé d'une ségrégation de noyaux des bactéries en

particulier dans le cas de mutations récessives. En outre, NEWCOMB et SCOTT, 1948, ont émis l'hypothèse qu'une partie de ce délai dans l'apparition des mutants induits pouvait également être due à une reprise irrégulière des divisions des bactéries mutées.

En 1953, DEMEREC et CAHN ont montré que l'irrégularité des divisions, et la ségrégation des noyaux multiples ne rendaient compte que partiellement de ce phénomène. LEDERBERG (1951) a montré que le caractère S_mR est récessif : la ségrégation préalable des noyaux est donc nécessaire pour que l'expression phénotypique des bactéries mutées puisse avoir lieu. HAYES (1957) a montré que l'expression phénotypique totale des recombinants T_1R nécessitait 4 générations : ceci peut s'expliquer par le fait que les modifications phénotypiques concernant la paroi cellulaire et sont par conséquent plus lentes à s'exprimer que la seule synthèse d'un nouvel enzyme. Cet ensemble de données explique en grande partie l'apparition retardée des mutants T_1R induits par irradiation U.V.

Dans le cas des mutations reverses de l'auxotrophie vers la prototrophie induite par rayons U.V., WITKIN (1956) a montré que le délai d'expression phénotypique et le délai d'établissement de la mutation induite ne dépassait pas une division. (En fait, l'expression phénotypique de ce type de mutation est immédiat). La corrélation apparente entre le nombre de division résiduelle effectuée sur les boîtes observées par DEMEREC et CAHN et le nombre de mutants induits étant un artefact dû au fait que certaines mutations induites par l'irradiation ont besoin pour s'établir d'une synthèse protéique dont l'intensité dépend de la teneur en bouillon nutritif des boîtes utilisées pour les détecter.

Le fait que l'on puisse faire varier la fréquence des mutants induits par l'irradiation ultra-violette en soumettant les bactéries à différents traitements après l'irradiation (traitement par la lumière visible, KELNER (1949) NOVICK et SZILLARD (1952) ; traitement par des métabolites ou des inhibiteurs métaboliques, WITKIN (1956), WITKIN et THEIL (1960)), indique bien qu'il s'écoule un certain laps de temps entre l'absorption de l'énergie par les bactéries au moment de l'irradiation et l'établissement des mutations induites.

Dans le cas de la mutation réverse Try^+ étudiée par WITKIN, ce laps de temps se terminerait à la première division qui suit l'irradiation.

On est ainsi amené à faire une distinction entre les mutations dont l'établissement est immédiat et celles dont l'établissement est retardé. Les causes de ce retard peuvent être, comme nous l'avons vu, soit d'origine phénotypique, c.à.d. liées à l'expression de la mutation (ségrégation de noyaux, délai d'expression phénotypique), soit d'origine génotypique, c.à.d. liée au mécanisme même de l'action de l'agent mutagène.

II - SIGNIFICATION DES RESULTATS

Plusieurs cas peuvent se présenter lorsqu'il s'agit de déterminer le nombre des mutants induits par un agent mutagène.

1) Il n'y a pas ou peu de mutants spontanés présents au moment du traitement ; même si l'agent mutagène a une action létale marquée, il ne peut opérer de sélection. Il suffit de tenir compte du nombre de mutants spontanés apparaissant au cours de la croissance résiduelle. Soit x ce nombre s'il y a y mu-

tants par boîte de bactéries traitées, on a y - x = z mutants induits par boîtes. La fréquence des mutants induits est alors égale à $\frac{z}{S}$, S étant le nombre de bactéries survivantes étalées sur les boîtes. La détermination de la fréquence des mutants induits par rapport au nombre de survivants et non par rapport à la population totale traitée est classique : on tient ainsi compte de l'effet létal de l'agent utilisé sur les mutants induits, en supposant toutefois qu'il est le même que sur les bactéries non mutées.

2) Il y a un assez grand nombre de mutants spontanés présents au moment du traitement par l'agent mutagène. Deux possibilités se présentent alors si l'agent étudié a un effet létal :

1/ On observe une augmentation du nombre initial des mutants présents , dans cette alternative, il ne peut s'agir de sélection des mutants préexistants .

2/ On observe seulement une augmentation de la fréquence des mutants . Dans ce dernier cas, il peut s'agir soit de sélection des mutants spontanés préexistants, soit de mutants induits par le traitement. Pour distinguer entre ces deux éventualités, on peut établir la courbe de survie de mutants spontanés et la comparer à celle de la souche mère ; on peut également rechercher l'existence d'une corrélation entre la fréquence de mutants spontanés présents au moment du traitement et la fréquence des mutants induits pour une survie donnée, calculée sur la base d'une sensibilité identique des mutants et des bactéries normales à l'agent étudié. L'absence de corrélation indique qu'il s'agit de mutants induits, alors que l'existence d'une corrélation indique un phénomène de sélection.

Lors de l'étude de l'induction, des mutations $Pro^- \rightarrow Pro^+$, nous nous sommes trouvés dans un cas où précisement le nombre de mutants spontanés présents dans la culture est assez important. Lors de l'action du peroxyde aux faibles doses, on observe une augmentation du nombre des mutants, aux doses plus fortes, on n'observe qu'une augmentation de la fréquence des mutants induits. Etant donné que nous avons étudié l'action mutagène de ce peroxyde à des survies faibles et surtout que nous avons utilisé cette mutation lors de l'étude du mécanisme de l'action mutagène de ce peroxyde, nous avons cherché à déterminer si les mutants isolés après traitement par le peroxyde succinique lorsque l'action létale est importante ne sont pas le résultat d'une sélection des mutants spontanés Pro^- présents au moment du traitement et qui seraient plus résistants à l'action létale du peroxyde que les bactéries Pro^+.

Nous avons déterminé la sensibilité de mutants spontanés Pro^+ à l'action létale du peroxyde : leur sensibilité est du même ordre que celle de la souche originelle, mais les variations des courbes de survie d'une expérience à l'autre sont importantes pour les 2 souches et rendent délicate une comparaison précise. Nous avons donc recherché l'existence d'une corrélation entre le nombre de mutants spontanés présents pendant le traitement et le nombre de mutants induits (tableau 1) : nous n'en avons pas trouvée. Les mutants Pro^+ que l'on détecte sont donc bien des mutants induits, même pour des doses de peroxyde succinique qui ne provoquent plus d'augmentation du nombre de mutants présents au moment du traitement.

TABLEAU 1

Absence de corrélation entre le nombre de mutants induits par le peroxyde succinique et la fréquence des mutants spontanés dans les cultures.

Survie %	Mutant spontané pour 10^8 bactéries	Mutants induits pour 10^8 survivants
10	100	390
11,4	77	50
10,5	58	760
10,6	49	58
10,9	48,5	264
11,9	36	230

III - MUTATIONS ETUDIEES

Nous avons étudié l'induction par les peroxydes et les rayons U.V. de 4 mutations différentes : la mutation de résistance au phage T_1 et la mutation de résistance à la Streptomycine, la mutation réverse Try^+ et la mutation réverse Pro^+.

1 - Mutation vers la résistance au phage T_1 (T_1 s $\rightarrow T_1 R$)

Lorsqu'on recherche ce genre de mutants, on isole en fait différents types de mutants, parmi ceux-ci on trouve des mutants qui d'emblée sont résistants à plusieurs phages, certains présentent en outre une déficience pour le tryptophane.

Les différents mutants isolés peuvent donc résulter, soit de changements à différents sites d'un même cistron, soit de changements à des sites déterminés de différents cistrons : nous n'avons pas essayé de faire la différence entre ces différents types de mutations car la souche de E. Coli B que nous avons utilisée ne se recombine pas.

Il s'agit dans tous les cas de mutations dont l'expression phénotypique n'est complète qu'après plusieurs générations : on permet donc aux bactéries traitées d'effectuer plusieurs divisions sur les boîtes avant de les soumettre à l'action sélective du phage.

Il n'y a pratiquement pas de mutants spontanés dans les cultures au moment où on étale les bactéries sur les boîtes, mais il en apparaît un certain nombre au cours de l'incubation qui précède l'adjonction des phages. Pour calculer le nombre de mutants induits, il faut retrancher du nombre total des mutants présents sur les boîtes de bactéries traitées, le nombre des mutants spontanés apparus au cours de l'incubation. Le nombre de mutants spontanés a été déterminé en incubant dans les mêmes conditions des bactéries témoins, ce qui nous a permis de constater l'existence d'un effet de la densité de la population important (GRIGG, 1952) : lorsque le nombre de bactéries étalées sur les boîtes augmente, la probabilité avec laquelle les individus mutés peuvent se multiplier pour donner une colonie visible diminue, de ce fait la fréquence des mutants spontanés décroît. Dans le cas de mutants spontanés de E. Coli B résistants à T_1, et dans nos conditions expérimentales, nous avons constaté que la fréquence des mutants spontanés qui apparaissent

est une fonction simple du nombre de bactéries présentes sur les boîtes au moment où on ajoute les phages (fig. III-1). Connaissant le nombre de bactéries par boîte au moment où on ajoute les phages, cette courbe permet de calculer la fréquence attendue de mutants spontanés, à déduire du nombre total de mutants présents sur les boîtes de bactéries traitées. Nous n'avons pas tenu compte de l'effet de densité de population sur les mutants induits : les fréquences calculées sont donc sans doute quelque peu inférieures aux valeurs réelles.

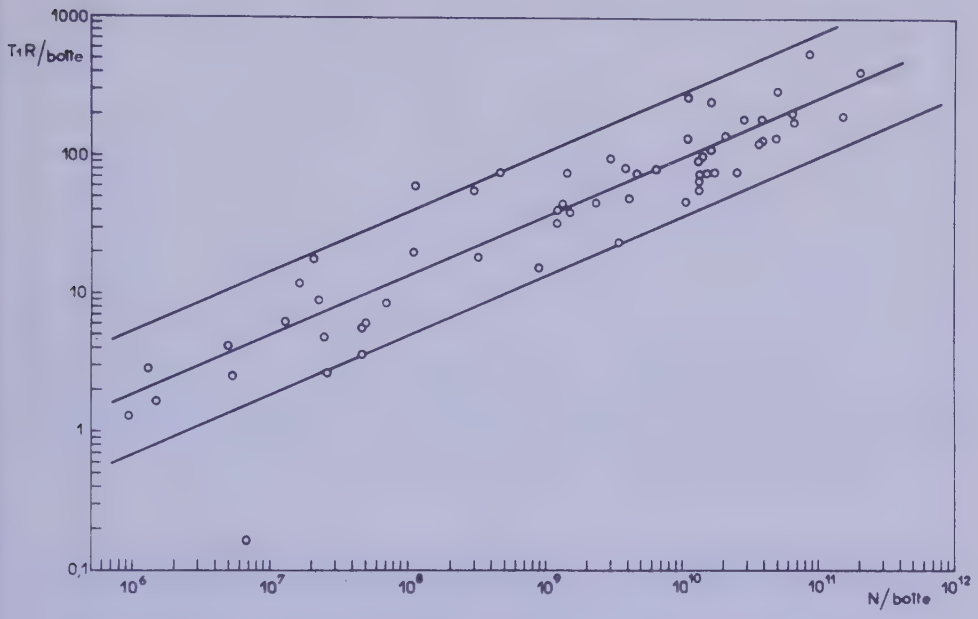


Figure III-1

Expression phénotypique des mutants résistants au phage T_1 de E. Coli B en fonction du nombre de bactéries présentes sur les boîtes au moment où on ajoute les phages T_1 .

Les résultats des différentes expériences sont résumés dans le tableau 2. On peut constater que :

Le peroxyde de cumène et les rayons U.V. induisent tous deux les mutations vers la résistance au phage T_1, alors que le peroxyde succinique est sans effet sur ce type de mutations. Pour une survie comparable, les rayons U.V. sont plus efficaces que le peroxyde de cumène et leur effet est plus régulier : il y a une augmentation de la moyenne des mutants induits en fonction de la diminution de survie alors que ceci n'apparaît pas dans le cas du peroxyde de cumène. Néanmoins, la courbe de survie de E. Coli B au peroxyde de cumène présente deux points d'inflexions, ceci indique que la diminution de survie n'est pas une fonction simple de la dose : le mécanisme de l'action létale du peroxyde de cumène est certainement très complexe, ce qui peut-être est à l'origine de l'absence de corrélation entre la survie et la fréquence des mutants induits. Quelle que soit la complexité de son action, le peroxyde de cumène a une action mutagène indiscutable sur ce type de mutations, et l'absence d'effet mutagène du peroxyde succinique est également particulièrement remarquable.

TABLEAU 2

Induction de mutations de résistance au phage T_1 chez E. Coli B

Peroxyde succinique		Peroxyde de Cumène		Rayons U.V.	
survie %	Mutants induits p.10^6S	survie %	M.i.p.10^6S	survie %	M.i.p.10^6S
30	0	29	130	7	6,5
10,9	0	12,5	21	2,3	74
1,3	0	5,3	14	0,31	127
0,75	0	3,4	57	0,14	230
0,24	0	1,9	16	0,039	286
0,08	0	1	8	0,012	240
0,009	0	1	18	0,007	390
		0,79	760	0,003	1500

On procède comme il est indiqué p. 7 dans matériel et méthodes : le traitement par les agents mutagènes a lieu lorsque les bactéries ont été lavées et resuspendues en tampon D. Après le traitement par les peroxydes, on centrifuge les bactéries avant de les étaler afin d'éliminer le peroxyde restant dans le surnageant.

2 - Induction de mutations de résistance à la streptomycine par le peroxyde succinique, le peroxyde de cumène, et les rayons U.V. chez E. Coli B.

Ici encore on isole une classe de mutants, puisque les mutants isolés peuvent présenter des niveaux de résistance à la streptomycine assez différents (résistant à 20 µg/ml, 100 µg/ml, 1 000 µg/ml de streptomycine). Encore une fois, on ne sait s'il s'agit de mutations à différents sites d'un même cistron, ou à des sites déterminés dans des cistrons différents.

La fréquence des mutants spontanés résistant à la streptomycine est si faible qu'il n'y a jamais de mutants spontanés dans les cultures au moment du traitement. L'expression phénotypique de la résistance à la streptomycine n'est pas immédiate : (LEDERBERG, 1951) il faut donc laisser croître les bactéries pendant un certain temps avant d'ajouter l'antibiotique. Nous avons procédé comme pour la détection des mutations vers la résistance au phage T_1 et nous avons laissé les bactéries faire une dizaine de divisions sur les boîtes avant de rajouter la streptomycine. Dans ces conditions, il apparaît quelques mutants spontanés pendant la croissance sur boîte des bactéries témoins, dont on tient compte dans le calcul des mutations induites. Dans nos conditions expérimentales nous n'avons pas observé d'effet de population.

Des trois agents étudiés, l'irradiation ultra-violette est le plus efficace pour l'induction de mutants résistant à la streptomycine, le peroxyde succinique a également une action mutagène nette, alors que le peroxyde de cumène est presque sans action. Les deux peroxydes étudiés présentent donc une spécificité d'action mutagène : le peroxyde succinique est incapable

TABLEAU 3

Induction de mutations conférant la résistance à la streptomycine chez E. Coli B traité par différents agents.

Peroxyde succinique		Peroxyde de Cumène		Rayons U.V.	
survie %	M.p.10^6S	survie %	M.p.10^6S	survie %	M.p.10^6S
0,39	0,12	73	0	3	0,7
0,33	0,03	54	0	1,57	2,8
0,12	0,04	16	0,34	0,54	5,7
0,07	27	8,3	0,055	0,29	100
0,04	48	6	0,008	0,04	194
0,04	0	2,2	0	0,02	350
0,02	0	1,3	0	0,0047	600
0,004	39	0,6	0,014		
0,003	0	0,3	0		
		0,2	0		
		0,03	0		

Les conditions de traitements sont les mêmes que dans le cas de la recherche des mutants T_1R (tableau 2).

d'induire la mutation de résistance au phage T_1 alors qu'il peut induire la mutation de résistance à la streptomycine, le peroxyde de cumène au contraire induit la mutation de résistance au phage T_1, alors qu'il ne peut pratiquement pas induire la mutation le résistance à la streptomycine.

3 - Induction de la mutation réverse $Try^- \rightarrow Try^+$

Il s'agit ici de l'étude d'une mutation réverse, c.à.d. d'une mutation qui restitue une fonction perdue par une première mutation. Dans le cas de réversion vraie, le changement mutationnel a lieu au site initialement modifié, s'il s'agit de réversion partielle les changements mutationnels peuvent affecter des sites différents situés toutefois à l'intérieur du cistron initialement modifié, enfin, il peut s'agir de suppresseurs, c.à.d.de changements qui affectent des cistrons différents du cistron initialement modifié, et sont cependant susceptibles de permettre la restitution de la fonction manquante par des mécanismes dont on commence seulement depuis peu à entrevoir la nature (BENZER et CHAMPE, 1962).

Encore une fois, bien que cela eut présenté un intérêt certain, nous n'avons pas cherché à faire la distinction entre ces éventualités puisque la souche de E. Coli 15 T^{-913} que nous avons utilisée ne se recombine pas et n'est pas transductible. Si nous avons utilisé cette souche, c'est afin de comparer l'action mutagène sur un même organisme, des peroxydes organiques et du 5-iodouracile. En effet, le 5-iodouracile, qui est un analogue

de la thymine, s'incorpore spécifiquement dans l'ADN (D.B DUNN et J.D. SMITH, 1954 ; S. ZAMENHOF et F.C. GRIBOF, 1954) à la place de la thymine, en particulier chez les souches déficientes en thymine telles que E. Coli 15 T^{-913}. Cette incorporation est également susceptible d'avoir des effets mutagènes et cela par un mécanisme qui est forcément de nature indirecte. En fait, la comparaison que nous voulions faire s'est avérée impossible dans le cas de la mutation Try^+ car les mutants Try^+ spontanés sont sélectionnés dans les conditions qui permettent l'incorporation de l'analogue dans l'ADN bactérien (D. LUZZATI, 1959), et nous n'avons pu comparer l'action mutagène du 5-iodouracile à celle des peroxydes, que dans le cas de l'induction de la mutation Pro^+.

Lors de cette étude nous avons, d'une part, déterminé le nombre des mutants induits dans des conditions ne permettant que la détection des mutants "immédiats" (O-point mutation) c.à.d. établis et exprimé de suite après le traitement. Pour cela on étale les bactéries traitées sur du milieu synthétique gélosé ne contant pas de tryptophane. D'autre part, nous avons étudié l'induction de mutations dans des conditions où l'on permet aux bactéries d'effectuer une certaine croissance résiduelle sur les boîtes, c.à.d. en étalant les bactéries traitées sur du milieu synthétique gélosé contenant une faible quantité de tryptophane (0,1 $\mu g/cm^3$). (Si on augmente trop la concentration de tryptophane, on observe un effet de densité de population qui empêche l'apparition d'une partie des mutants spontanés). Dans ces conditions, quelles que soient les concentrations de bactéries témoins étalées sur les boîtes après 48 h d'incubation à 37°, on peut dénombrer une moyenne de 3,6 mutants spontanés par boîte, apparus au cours de la croissance résiduelle (tableau 4).

TABLEAU 4

Mutants spontanés Try^+ apparaissent lors de la croissance résiduelle en présence de Tryptophane.

Nb. bact/boîte Quantité relative	Mutants spont. sur gélose sans tryptophane	Mutants spont. sur gélose avec 0,1 µg Try/ml	Mutants apparus pendant la croissance résiduelle
1	8,5	11,5	3
1/2	4,6	9,0	4,4
1/5	1,8	6,0	4,2
1/20	0,9	4,7	3,6
1/40	0,4	3,2	2,8

Dans chaque expérience, nous avons étalé parallèlement les bactéries témoins et les bactéries traitées sur de la gélose sans tryptophane et sur de la gélose contenant 0,1 µg tryptophane par cm^3 : on peut ainsi calculer d'une part la fréquence des mutants spontanés au moment du traitement et d'autre part déterminer le nombre de mutants spontanés apparaissent lors de la croissance résiduelle dans des conditions rigoureusement identiques à celles des témoins.

a) Induction de mutations Try^+ dont l'établissement est immédiat

Ces mutations sont celles que l'on détecte en étalant les bactéries traitées sur de la gélose synthétique sans tryptophane. Les résultats qui figurent au tableau montrent que les 4 agents utilisés induisent ce type de mutation.

TABLEAU 5

Induction de mutations Try^+ chez E. Coli 15 T^{-913} par différents agents.

A. Etalement sur gélose sans tryptophane							
Px. succinique		Px. de cumène		Px. de thymine		Rayons U.V.	
Survie %	Mut. p.10^8S	Survie %	Mut. p.10^8S	Survie %	Mut. p.10 S	Survie %	Mut. p.10^8S
68	0	42,5	157	49	0	40	1,3
39	0	17	37	11,7	3	40	1,2
35	55	4,2	4000	4,8	4,9	24	67
18	30	2,5	140	0,0002	$4,10^5$	20	9,6
6	230					19	1,6
3	32					20	1,5
1,75	26						
1,4	71						
B. Etalement en présence de 0,1 µg de tryptophane							
29	25					40	147
17,3	47					40	140
						23,4	298
						40	800
						17,5	1250

Les bactéries en phase exponentielle sont centrifugées, lavées puis traitées par le peroxydes à la concentration choisie pendant 30 min. On centrifuge ensuite, les remet en suspension en tampon D. et on étale sur le milieu synthétique gélosé.

Le peroxyde succinique, le peroxyde de cumène et le peroxyde de thymine induisent cette mutation réverse quoiqu'assez faiblement, en ce qui concerne le peroxyde succinique et le peroxyde de thymine, toutefois, leur efficacité est supérieure à celle des rayons U. V.

b) Par contre, lorsqu'on permet aux bactéries traitées d'effectuer une croissance résiduelle en les étalant sur de la gélose contenant 0,1 µg de tryptophane par ml, on observe une augmentation très importante de la fréquence des mutants induits par irradiation ultra-violette, alors que la fréquence des mutations induites par le peroxyde succinique reste inchangée : les rayons U.V. deviennent alors à nouveau l'agent mutagène le plus efficace.

Cette différence de comportement selon les milieux d'étalement indique que le mécanisme de l'induction des mutations par ces deux agents est certainement différent, et suggère que la plus grande partie des mutations induites par les U.V. ne peuvent s'établir que lorsqu'on permet aux bactéries irradiées d'effectuer une croissance résiduelle leur permettant de se diviser. Cette croissance résiduelle ne semble pas nécessaire à l'établissement des mutations Try^+ induites par le peroxyde succinique.

4 - Induction de la mutation $Pro^- \rightarrow Pro^+$

Ici encore, il s'agit de l'étude d'une mutation réverse, à laquelle s'appliquent les remarques que nous avons faites en abordant celle de la mutation Try^+.

Les premières recherches de mutants Pro^+ induits ont été effectuées en utilisant du milieu synthétique gélosé sans addition de Proline. Dans ces conditions, on ne devrait détecter que des mutants "immédiats". Mais, nous nous sommes rapidement aperçus que les bactéries effectuent sur ce milieu une croissance résiduelle qui est visible au microscope, au grossissement 1 200 ; nous n'avons donc pas pu étudier l'induction de mutants "immédiats". L'importance de cette croissance résiduelle varie selon les lots de gélose Difco utilisés : la gélose contient vraisemblablement des traces de proline en quantité variable. Lorsqu'on étale plusieurs dilutions de bactéries témoins provenant d'une même culture, lavées 2 fois en sérum physiologique, sur de la gélose sans proline, on constate que le nombre de mutants spontanés qui apparaît sur les boîtes n'est pas proportionnel au nombre de bactéries étalées, mais que la courbe représentant le log du nombre de mutants présents par boîte en fonction du log du nombre de bactéries étalées par boîte, est une droite dont la pente est constante d'une expérience à l'autre lorsque la gélose provient d'un même lot. Pour la plupart des lots de gélose, on trouve une pente de 0,72, quelquefois 0,5 ou 1. (1 = valeur normale). On peut donc, connaissant cette valeur, calculer le nombre de mutants spontanés attendus, pour différentes concentrations de bactéries étalées, à partir d'une seule concentration de bactéries témoins étalées. On déduit ensuite ce nombre du nombre de mutants "induits" observés. La non-proportionnalité entre le nombre de bactéries étalées et le nombre de mutants spontanés observés sur les boîtes est sans la conséquence de 2 phénomènes concomitants : d'une part, la croissance résiduelle des bactéries, d'autre part, l'existence d'un effet de densité de population. Ce dernier est manifeste lorsqu'on étale un grand nombre de bactéries par boîte (tableau 6) (plus de 10^8 bactéries/boîte).

TABLEAU 6

Expression des mutants spontanés Pro^+ en fonction de la concentration de bactéries étalées sur les boîtes.

Concentration relative des bactéries sur les boîtes	Bactéries étalées par boîte de milieu gélosé sans addition de proline	Mutants Pro^+ par boîte
1	$1,6.10^9$	1,5
1/6	$2,7.10^8$	10,6
1/10	$1,6.10^8$	16,0
1/15	1.10^8	11,0

Le peroxyde succinique et les rayons U.V. induisent la mutation Pro$^+$ avec une efficacité voisine, alors que le peroxyde de cumène est totalement inactif. (tableau 7) En fait, parmi les bactéries traitées par le peroxyde de cumène, il y a systématiquement moins de mutants Pro$^+$ que ceux attendus si la sensibilité à l'action létale du peroxyde de cumène était la même pour les mutants Pro$^+$ et Pro$^-$.

TABLEAU 7

Induction de mutations réverses Pro$^+$ par différents agents.

Px. de cumène		Px. succinique		Rayons U.V.		Px. de thymine	
Survie	M.i.p. 10^8S	Survie	M.i.p. 10^8S	Survie	M.i.p. 10^6S	Survie	M.i.p. 10^8S
				50	1070		
42	0	56	2	33	1150	49	9
17	0	44	11	26	95	11,7	27
7,7	0	28	63	24	163	4,8	40
5	0	20	140				
4,2	0	6	173				
2,5	0	5,5	1 000				
1,6	0	3	470				

Le traitement est le même que lors de la recherche des mutants Try$^+$ (voir légende du tableau 5).

Nous n'avons pu trouver jusqu'à présent d'explication à ce phénomène : en effet, nous avons vérifié que la sensibilité des mutants Pro$^+$ à l'action létale du peroxyde de cumène est la même que celle des mutants Pro$^+$ (figure III-2) et qu'il n'y a pas d'effet inhibiteur des bactéries Pro$^+$ tuées par le peroxyde sur l'expression des mutants spontanés Pro$^+$ (tableau 8).

Dans le cas des rayons U.V., l'étalement en présence de proline, contrairement à ce que nous avons observé lors de l'induction de la mutation Try$^+$, ne provoque pas d'augmentation importante du nombre de mutants induits (tableau 9) ; en présence d'un excès de proline (0,1 µg/ml de milieu gélosé) on observe même une diminution des mutants induits, et sur le milieu gélosé contenant une faible quantité de bouillon (1 ml d'une solution de bouillon nutritif Difco à 8 g/litre pour 100 ml de milieu synthétique gélosé), on n'observe plus du tout de mutants induits (tableau 9).

On observe donc un comportement analogue, que les bactéries aient été traitées par le peroxyde succinique ou les rayons U.V. : il semble que ce comportement soit caractéristique de cette mutation, (toutefois, l'effet de l'addition de faible quantité de proline au milieu de sélection semble plus important chez les bactéries irradiées) alors que lors de l'induction des mutations Try$^+$ la différence observée entre le peroxyde succinique et les rayons U.V. semble bien être caractéristique du mode d'action des 2 agents

TABLEAU 8

Action des bactéries Pro⁻, tuées par le peroxyde de cumène, sur la croissance des bactéries Pro⁺

	Bact. Pro⁺ seules	Bact. Pro⁺ + bact. Pro⁻ tuées Concentration relatives de bactéries Pro⁻					Bact. Pro⁻ seules Conc. 1
		1	1/2	1/5	1/10	1/50	
Colonies Pro⁺/boîte	124±9,9	121±9,1	128±6	98±11	125±6,7	112±10,3	0

Nous avons traité une suspension de bactéries Pro⁻ ($1,3.10^9$/ml) par du peroxyde de cumène (10^{-4} g/ml pendant 120 min.), nous l'avons concentrée de manière à avoir $1,3.10^{10}$ bact./ml puis nous avons mélangé des parties aliquotes de différentes dilutions faites à partir de cette suspension avec 0,1 ml d'une suspension de bactéries Pro⁺. Nous avons étalé ces différents mélanges sur du milieu synthétique gélosé ne contenant pas de proline. Après 48h. d'incubation on dénombre les colonies de bactéries Pro⁺.

TABLEAU 9

Effet de l'étalement de bactéries Pro⁻ irradiées sur du milieu synthétique gélosé contenant des quantités variables de proline sur le nombre de mutants induits observés.

Proline µg/ml de milieu	0	0,01	0,1	Bouillon 1 %
Mutants Pro⁺ pour 10 S.	1070	1300	570	0

Dose U.V. 150 ergs/mm². Survie 50 %.

TABLEAU 10

Effet de l'étalement de bactéries Pro⁻ traitées par le peroxyde succinique sur du milieu synthétique gélosé contenant des quantités variables de proline sur le nombre de mutants induits observés.

Proline µg/ml de milieu	0	0,2	2	2 µg HC/ml	Bouillon %
Mutants Pro⁺ pour 10 S.	100	72	36	39	-
	90	-	-	-	0

Peroxyde 10^{-4} g/ml pendant 30 min. HC = hydrolysat de caseine Difco.

mutagènes en question. Toutefois, pour distinguer plus clairement entre les propriétés liées à l'expression phénotypiques des mutations et les propriétés caractéristiques du mode d'action des agents mutagènes étudiés, il était nécessaire d'entreprendre des recherches plus précises. C'est ce que nous avons fait, et nous décrivons les résultats que nous avons obtenus dans la suite de notre exposé.

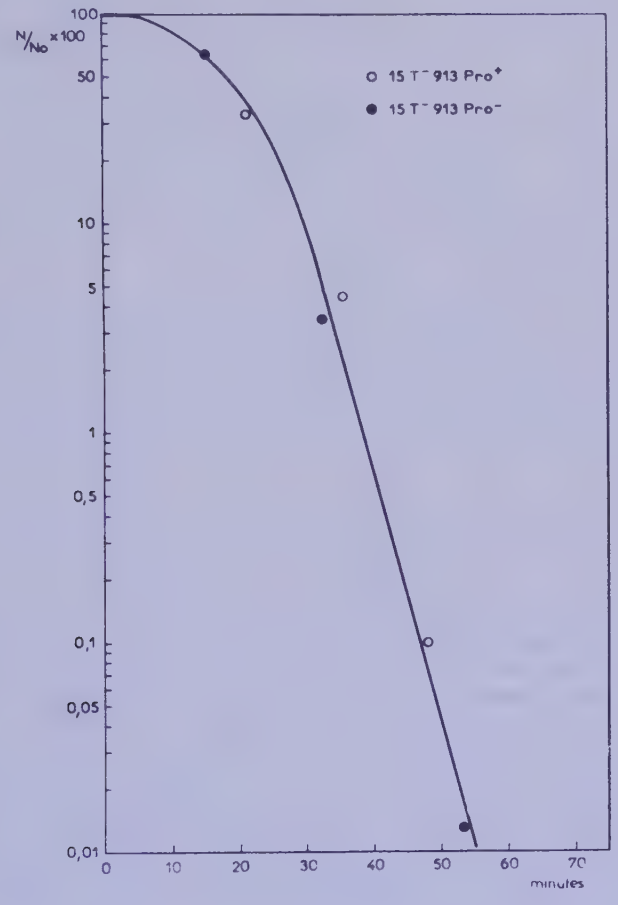


Figure III-2

Sensibilité à l'action létale du peroxyde de cumène de 15 T^{-913} Pro^- et 15 T^{-913} Pro^+ mesurée en fonction du temps de traitement. Concentration de peroxyde 10^{-4} g/ml.

DISCUSSION

Les expériences que nous avons réalisées ont mis en évidence l'action mutagène sur E. Coli de trois peroxydes organiques pour lesquels cette action n'avait pas encore été démontrée.

En effet, les premiers résultats concernant l'action mutagène de peroxydes organiques sont ceux de WYSS et coll. (1948), mais les peroxydes organiques qu'ils avaient employés étant produits par l'action soit de rayonnement U.V. de haute énergie, soit de l'eau oxygénée sur le milieu de culture des bactéries, ne sont pas définis ; DICKEY, CLELAND et LOTZ (1949) ont induits des mutations chez Neurospora au moyen de bishydroxyméthylperoxyde, d'hydroxyméthyl-terbutylperoxyde, de diisopropyletherperoxyde, de terbutylperoxyde et d'eau oxygénée ; ALTENBURG (1954) a induit des mutations chez la Drosophile au moyen de terbutylperoxyde, c'est également avec le terbutylperoxyde que LOVELESS (1961) a induit des cassures chromosomiques chez les plantes. Puis LATARJET (1956) a étudié l'action "radiomimétique" du peroxyde succinique et du peroxyde de cumène, mais leur action mutagène n'avait pas encore été mise en évidence.

Le fait que l'eau oxygénée soit mutagène chez Neurospora (DICKEY et coll. 1949) mais pas chez Staphylococcus aureus (WYSS et coll. 1948) indiquait l'existence d'une spécificité d'action liée à l'espèce traitée. Les résultats que nous avons obtenus indiquent en outre, que sur un même organisme, les peroxydes organiques sont susceptibles d'affecter différemment des sites de mutations distincts (tableaux 2 à 7) : il y a donc une réactivité spécifique des différents sites de mutations étudiés : ainsi le peroxyde succinique induit plus facilement la mutation qui confère l'indépendance vis-à-vis de la proline que celle qui confère l'indépendance vis-à-vis du tryptophane, pourtant le site de mutation Pro^+ qui est complètement insensible à l'action du peroxyde de cumène, mute spontanément assez facilement.

Il n'y a pas de relation manifeste entre le taux de mutation spontanée et l'intensité d'action d'un mutagène : certaines mutations rares spontanément sont produites à une fréquence aussi élevée que d'autres, qui spontanément sont beaucoup plus fréquentes. Ainsi les U.V. induisent avec une efficacité voisine la mutation de résistance à la streptomycine et celle de la résistance au phage T_1, pourtant les taux de mutation spontanée de ces deux types de mutations diffèrent énormément (10^{-8}/bactérie/cycle de division pour T_1R et 10^{-11}/bactérie/cycle de division pour S_mR.) Au contraire, un site qui mute spontanément facilement peut être tout-à-fait insensible à l'action d'un agent mutagène actif sur d'autres sites : le peroxyde de cumène par exemple induit la mutation de résistance au phage T_1 mais pas du tout la mutation Pro^+, le peroxyde succinique au contraire induit cette mutation mais non point celle de la résistance à T_1.

L'étude de l'action de ces peroxydes organiques sur E. Coli nous a donc permis de montrer qu'ils étaient mutagènes et spécifiques. La comparaison avec le rayonnement U.V. a montré que ce rayonnement est un agent mutagène plus efficace mais beaucoup moins spécifique que les peroxydes.

Au moment où nous obtenions ces résultats dont une partie a été publiée (D. LUZZATI et M.R. CHEVALLIER, 1957 ; M.R. CHEVALLIER et D. LUZZATI, 1960), des résultats de même nature furent obtenus sur les bactéries par GLOVER (1956), DEMEREC (1953, 1960), RUDNER (1960), KIRCHNER

(1960), MARGOLIN et MUKAI (1961), STREZLOFF (1961), indiquant que des sites de mutations différents ne réagissent pas de la même manière suivant les agents mutagènes utilisés. Ces résultats sont donc généralisables. BENZER et FREESE (1958) entreprirent une analyse détaillée de la spécificité mutagénique chez le phage T_1. Le système utilisé par ces auteurs présente certains avantages qui leur ont permis et de localiser avec précision les différents sites de mutations étudiés et de faire des expériences beaucoup plus aisées pour détecter l'apparition de mutants induits. Les résultats obtenus sur ce système ont conduit FREESE à introduire la distinction entre les mutations produites par "transition" (c.à.d. par la substitution d'une purine par une autre purine ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine dans la séquence des bases de l'ADN) et par "transversion" (c.à.d. produites par la substitution d'une purine par une pyrimidine et vice-versa). Selon FREESE (1959 a et b), cette distinction est intéressante car les agents mutagènes que sont les analogues de bases ne sont capables d'induire que des transitions (ceci dans les deux directions), aussi des mutants induits par transition doivent réverser sous l'action d'analogues de bases, alors que des mutants produits par un autre type de changement ne doivent pas pouvoir réverser sous l'action des analogues. Effectivement, dans le cas des mutations de la région rII du phage T_4 étudiées par FREESE, les mutants induits par des analogues de bases ou des agents susceptibles de produire des transitions telles que NO_2H, sont susceptibles de réverser sous l'influence de ces mêmes analogues. Au contraire, la plupart des mutants spontanés ou induits par la proflavine ne répondent pas aux analogues de bases, de même qu'un tiers des mutants induits par un bas pH ou par l'éthyléthanesulfonate. Pour FREESE, il est clair que ces mutants qui ne répondent pas aux analogues de bases résultent d'un changement différent d'une transition.

En appliquant le même type de déduction aux résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de l'induction de la mutation Pro^+ qui est induite par le peroxyde succinique, les U.V. et spontanément mais qui n'est pas induite par le 5-iodouracile (D. LUZZATI, 1959, non publié), on est tenté de déduire que cette mutation ne peut être induite par transition et que le peroxyde succinique est un agent capable de provoquer d'autres types de changements que les transitions, ce qui exclurait un mécanisme de production des mutations Pro^+ par la formation intracellulaire sous l'action du peroxyde, d'analogues de bases susceptibles d'être incorporés dans l'ADN. Ceci serait donc plutôt en faveur de l'existence d'un mécanisme d'action directe du peroxyde sur l'ADN intracellulaire.

Il faut remarquer en outre, que, si la spécificité de l'action mutagène, lors de l'induction de mutations réverses, dépend de l'aptitude qu'ont les agents mutagènes à provoquer les changements de la séquence des bases de l'ADN qui lui permettront à nouveau de coder une protéine biologiquement active, le milieu de culture des bactéries et le milieu de sélection des mutants ont une influence manifeste sur la fréquence des mutants induits que l'on détecte, ainsi que nous l'avons observé lors de l'étude de l'induction, tant de la mutation Pro^+ que de la mutation Try^+. Il est donc possible que certaines interactions particulières entre l'agent mutagène et le métabolisme bactérien favorisent soit l'établissement, soit l'expression phénotypique de certaines mutations, ce qui pose la question de savoir si la spécificité est liée au mécanisme de l'action chimique de l'agent mutagène ou aux modalités de l'expression phénotypique des mutations en cause.

Connaissant l'existence d'une spécificité, il importe donc d'en rechercher les causes, afin précisement d'en déterminer la nature. C'est pourquoi nous nous sommes proposé d'étudier plus particulièrement l'action du peroxyde succinique sur les bactéries, afin de tenter de faire la relation entre son action chimique et son action mutagène spécifique chez les bactéries.

RESUME ET CONCLUSION

Nous avons étudié l'action mutagène de trois peroxydes organiques et des rayons U.V. sur plusieurs sites de mutations de E. Coli et nous avons mis en évidence l'existence d'une action mutagène spécifique de ces peroxydes.

Les résultats que nous avons obtenus peuvent être schématisés de la façon suivante :

Intensité relative des effets mutagènes

Mutation étudiée	Peroxyde succinique	Peroxyde de cumène	Peroxyde de thymine	Rayons U.V.
Sm s → SmR	±	0	-	++
T_1 s → T_1R	0	+	-	++
Pro^- → Pro^+	++	0	+	++
Try^- → Try^+	±	+	+	+

Les rayons U.V. ont donc une action moins spécifique mais nettement plus intense que celle des peroxydes organiques que nous avons employé.

Nous avons observé en outre des intensités d'action mutagène qui varient selon la composition du milieu d'étalement :

1) Dans le cas de l'induction de la mutation réverse Pro^+, l'addition d'une faible quantité de proline à la gélose de sélection provoque une diminution du nombre des mutants induits tant par les rayons U. V. que par le peroxyde succinique.

2) Dans le cas de l'induction de la mutation réverse Try^+, l'addition de faible quantité de tryptophane à la gélose de sélection provoque une augmentation de 100 fois environ du nombre des mutants induits par les rayons U.V. (par rapport à ce que l'on observe lorsque la gélose ne contient pas du tout de tryptophane) alors que le nombre des mutants Try^+ induits par le peroxyde succinique reste pratiquement inchangé.

Deuxième Partie

RECHERCHE DU MÉCANISME DE L'ACTION MUTAGÈNE DU PEROXYDE SUCCINIQUE

INTRODUCTION

Théoriquement, tout effet mutagène provient d'un changement de la séquence des bases de l'ADN, et la spécificité d'un agent mutagène dépend donc des modifications des bases qu'il est susceptible d'induire. Ces modifications sont en relation étroite avec le mécanisme de son action chimique, mais leur probabilité d'apparition dépend sans doute également de la séquence locale des bases.

Il importe donc pour déterminer les raisons de la spécificité d'un agent mutagène donné d'étudier le mécanisme de son action chimique sur l'ADN et ses précurseurs tant in vitro que "in vivo", car on ne peut extrapoler directement les résultats obtenus "in vitro" à ce qui se passe réellement "in vivo", étant donné la variabilité et la complexité des mécanismes biologiques susceptibles de modifier "in vivo" tant la nature des réactions chimiques que leur rendement.

En fait, il se peut même que la spécificité d'action d'un agent mutagène que l'on observe ne résulte pas uniquement de sa spécificité d'action chimique sur l'une ou l'autre des bases de l'ADN, mais qu'elle provienne soit d'interaction particulières entre le métabolisme bactérien et le processus d'action de l'agent considéré (en particulier dans le cas d'un effet mutagène indirect), soit des modalités particulières de l'expression du génome muté dans les conditions anormales qui suivent le traitement.

Ayant mis en évidence une action mutagène spécifique des différents peroxydes organiques que nous avions employés, nous avons voulu rechercher les causes de la spécificité de l'un d'entre eux, le peroxyde succinique.

Nous avons tout d'abord essayé de déterminer si l'action mutagène du peroxyde succinique dépendait d'une action directe sur l'ADN bactérien, ou était de nature indirecte (par l'intermédiaire de précurseurs modifiés). Les résultats que nous avons obtenus, tout en étant en faveur d'une action mutagène par effet direct, nous ont montré qu'il était possible de faire varier l'intensité de l'action mutagène du peroxyde en modifiant les conditions métaboliques des bactéries traitées. Nous nous sommes donc ensuite attachés

à préciser les effets des différentes conditions métaboliques sur la fréquence des mutations induites pour deux sites de mutations portés par un même génome. Afin de déterminer l'existence ou la non existence d'effets spécifiques qui seraient liés à l'expression phénotypique des mutations plutôt qu'au mécanisme de l'action mutagène de cet agent, nous avons tout d'abord comparé l'induction des deux mutations réverses Try^+ et Pro^+ de E. Coli 15 T^{-913} par ce peroxyde et les rayons U.V. dans différentes conditions métaboliques. Nous avons ainsi pu montrer que l'action mutagène spécifique de ces deux agents ne dépend pas des particularités de l'expression phénotypique de ces deux mutations mais bien d'une spécificité des processus même de leur action mutagène.

Nous avons ensuite essayé de préciser le mécanisme des effets métaboliques observés en étudiant parallélement ces effets sur la synthèse des différents constituants cellulaires et sur la fréquence des mutants induits.

Cette étude nous a amenés à proposer un modèle du mécanisme d'action mutagène du peroxyde succinique "in vivo".

CHAPITRE IV

ACTION DU PEROXYDE SUCCINIQUE SUR L'ADN D'HEMOPHILUS INFLUENZAE IN VIVO

On savait depuis un certain temps que le peroxyde succinique réagit in vitro avec l'ADN dont il modifie essentiellement les bases (LATARJET, 1956, LATARJET et REBEYROTTE, 1958, D. LUZZATI et coll., 1961). Mais il n'était pas prouvé qu'in vivo le peroxyde succinique soit également susceptible de réagir avec l'ADN. Nous avons donc cherché à déterminer si le peroxyde succinique était capable de provoquer des modifications des propriétés biologiques de l'ADN intracellulaire. Dans ce but, nous avons étudié l'action du peroxyde succinique sur l'ADN transformant d'Hemophilus Influenzae "in vivo".

La transformation consiste en un transfert de caractères génétiques (marqueurs) par l'intermédiaire de particules d'ADN (extraites d'une souche bactérienne présentant le caractère considéré) à des bactéries de la même espèce que celles dont on a extrait l'ADN, mais qui sont dépourvues de ce caractère. On peut donc étudier l'action d'un agent donné sur l'activité transformante de solutions d'ADN après l'extraction de celui-ci à partir des bactéries donatrices, et après purification (étude in vitro), mais on peut également étudier l'action d'un agent donné sur l'activité transformante de l'ADN in vivo : dans ce cas, on fait agir l'agent considéré sur les bactéries entières, on extrait l'ADN, et on détermine ensuite son activité transformante spécifique, c'est-à-dire comparativement à celle de l'ADN extrait d'une fraction aliquote de bactéries témoins.

STUY (1961) a mis au point une technique qui permet d'extraire quantitativement l'ADN de petites quantités de cellules de H. Influenzae. Il a étudié par cette méthode l'inactivation du marqueur "Streptomycine" après irradiation des cellules d'H. Influenzae par les rayons X et les rayons U. V.

La technique que nous avons utilisée (technique similaire à celle de Stuy) est la suivante :

1 - Traitement des bactéries par le peroxyde succinique.

On utilise des bactéries résistantes à la streptomycine, (Rd SmR), en phase exponentielle de croissance. On les centrifuge et les resuspend en tampon phosphate 0, 1 M.

On prélève une partie aliquote que l'on traite par le peroxyde succinique, dont on fait varier soit la concentration, soit le temps d'action. On arrête la réaction en diluant à 10^{-2} dans du milieu de Levinthal froid, et on met les tubes dans la glace fondante. On prélève 0,1 ml pour la détermination du nombre de bactéries viables.

On centrifuge ensuite les bactéries peroxydées, ainsi que les bactéries témoins, on les lave avec une solution de ClNa 0,15 M + citrate 0,015 M, on centrifuge à nouveau et on congèle les culots.

2 - Préparation des lysats contenant l'ADN en solution.

On décongèle les culots auxquels on ajoute 1 ml d'un mélange de composition suivante :

ClNa 0,15 M ;

Citrate de Na 0,15 M ;

Laurylsulfate de Na 0,04 %.

Après un séjour de 10 min. à la température ambiante, les bactéries sont lysées. On dilue chaque lysat à 10^{-2} dans du sérum physiologique tamponné à pH 7 (Phosphate 0,01 M).

3 - Transformation par l'ADN contenu dans les lysats.

On ajoute 0,1 ml de bactéries précompétentes à 1 ml de lysat dilué. On met le mélange à 37° et on laisse les bactéries en contact avec l'ADN pendant 30 min. (temps de transformation). On dilue ensuite en 1/10 en milieu de Levinthal, on incube pendant 90 min. (temps d'expression) puis on étale une dilution appropriée sur de la gélose LEA à la streptomycine.

Nous avons effectué deux séries d'expériences :

1/ Nous avons fait agir une seule concentration de peroxyde succinique pendant un même temps sur des suspensions bactériennes de concentrations différentes.

Nous avons utilisé le peroxyde à la concentration de 10^{-3} g/ml et l'avons laissé agir pendant 20 min. sur 4 suspensions bactériennes dont on a fait varier la concentration (tableau 1).

TABLEAU 1

Nbre de bactéries/ml	Concentration d'ADN dans les lysats µg/ml	Nbre de bactéries transformées par l'ADN contenu dans les lysats		
		1 ADN des bactéries témoins	2 ADN des bactéries pxdées	3 Diff. %
1.10^9	0,006	$7,6.10^3$	$2,5.10^3$	32
$2,5.10^9$	0,014	$6,7.10^3$	$2,9.10^3$	43
5.10^9	0,029	$1,4.10^4$	$1,2.10^4$	81
10.10^9	0,058	$4,1.10^4$	$2,8.10^4$	68

Les résultats obtenus dans cette expérience indiquent comme on pouvait s'y attendre que la quantité d'ADN augmente avec le nombre de bactéries lysées, mais l'augmentation est irrégulière. Néanmoins, l'activité transformante de l'ADN contenu dans les lysats des bactéries peroxydées est inférieure à celle de l'ADN contenu dans les lysats provenant de bactéries témoins.

2/ Nous avons étudié l'action d'une concentration de peroxyde en fonction de la durée du traitement. Nous avons déterminé d'une part, l'effet du peroxyde succinique sur la viabilité des bactéries et d'autre part, l'effet du peroxyde sur l'activité biologique de l'ADN intrabactérien.

Dans une première série d'expérience nous avons fait agir le peroxyde succinique sur les bactéries à la concentration de 10^{-3} g/ml : à cette concentration, le peroxyde inactive progressivement le marqueur streptomycine (Sm) (fig. IV-1). La vitesse d'inactivation de ce marqueur in vivo est toutefois inférieure à celle que l'on observe lorsqu'on étudie l'inactivation du même marqueur in vitro (fig. IV-1, courbe b) néanmoins, les vitesse d'inactivation sont du même ordre de grandeur dans les deux cas. Par contre, la cinétique de l'action létale du peroxyde succinique sur les bactéries est beaucoup plus rapide que celle de l'inactivation du marqueur étudié : après 20 min. de traitement, il y a moins de 10^{-5} % de bactéries survivantes dans la population.

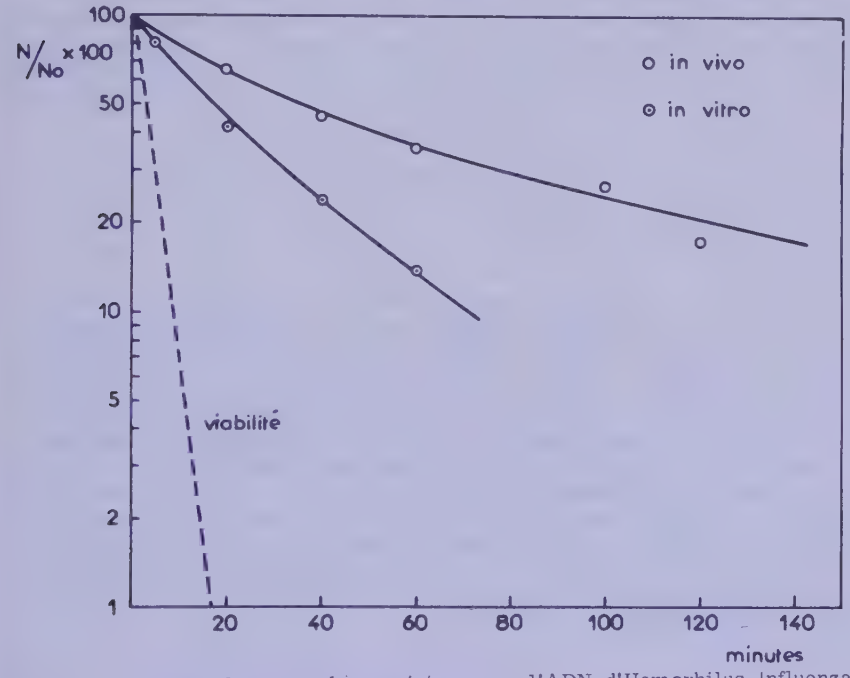


Fig. IV-1 - Action du peroxyde succinique sur l'ADN d'Hemophilus influenzae in vivo et in vitro. Concentration de peroxyde 10^{-3} g/ml.
—— marqueur Sm.
---- bactéries viables.

Nous avons étudié ensuite l'action inactivante du peroxyde sur le même marqueur streptomycine dans des conditions où la survie des bactéries traitées peut être aisément appréciée. Les résultats que nous avons obtenus lors de cette étude sont groupés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Exp n°	Temps de Traitement par le px. 2.10^{-4} g/ml	Nb bact. viables ml après le traitement	Survie en %	Nombre de bactéries transformées par l'ADN contenu ds les lysats			% d'activité transformante par rapport au témoin
				1e détermination	2e détermination	3e détermination	
1	0	$2,4\ 10^7$	100	$1,67\ 10^4$	$1,07\ 10^4$	$1,26\ 10^4$	100
	5'	$1\ 10^7$	42	$1,98\ 10^4$	$8\ 10^3$	$5,9\ 10^3$	80
	10'	$3,8\ 10^6$	15,4	$7,67\ 10^3$	$5,2\ 10^3$	$3,5\ 10^3$	39
	20'	$1\ 10^6$	4,4	$9\ 10^3$	$4,7\ 10^3$	$4,8\ 10^3$	43
	30'	$2,6\ 10^5$	9,9	$2,8\ 10^4$	$6,8\ 10^3$	$1,06\ 10^4$	106
	50'	$1,4\ 10^5$	0,56	$2,46\ 10^4$	$6,8\ 10^3$	$1,3\ 10^4$	100
	85'	-	-	$7,2\ 10^3$	$7,5\ 10^3$	$5,26\ 10^3$	53
2	0	$5,4\ 10^7$	100	$1,7\ 10^4$	-	-	100
	5'	$3,4\ 10^7$	64	$7\ 10^3$	-	-	42
	10'	$2,9\ 10^7$	55	$1,2\ 10^4$	-	-	71
	20'	$3,13\ 10^7$	59	$1,7\ 10^4$	-	-	104
	30'	$3,04\ 10^7$	56	$1,26\ 10^4$	-	-	76
	50'	$8,2\ 10^7$	15	$1,2\ 10^4$	-	-	75
	80'	-	-	$1,3\ 10^4$	-	-	78
3	0	$4,5\ 10^7$	100	$3,1\ 10^3$	-	-	100
	10'	$5,4\ 10^6$	12	$1,4$ -	-	-	47
	20'	$2\ 10^5$	0,45	$2,5$ -	-	-	81
	30'	$3\ 10^4$	0,06	$2,0$ -	-	-	65
	50'	$1,6\ 10^4$	0,03	$1,2$ -	-	-	38

L'inactivation du marqueur streptomycine quoiqu'indéniable est faible dans ces conditions, et il semble même qu'après un certain temps de traitement, variable d'une expérience à l'autre, il y ait une réaugmentation de l'activité transformante des lysats de bactéries peroxydées. Néanmoins, il est difficile d'être très affirmatif, car les déterminations de l'activité transformante résiduelle des lysats faites en triple dans l'expérience 1 (tableau 2) indiquent l'existence d'une non homogénéité des lysats ayant des effets d'autant plus sensibles que les expériences sont effectuées à des concentrations d'ADN où le nombre de bactéries transformées est proportionnel à la concentration d'ADN : même de faibles variations dans la teneur en ADN des parties aliquotes des lysats sont susceptibles de provoquer des variations importantes du nombre de bactéries transformées, ceci d'autant plus que l'inactivation n'est pas très importante.

DISCUSSION

Les expériences que nous avons décrites dans ce chapitre, ont été entreprises dans le but de mettre en évidence l'existence d'une action directe du peroxyde succinique sur l'ADN intracellulaire. Les résultats que nous avons

obtenus montrent qu'effectivement le peroxyde est susceptible d'agir directement sur l'ADN intrabactérien en d'inactivant ainsi le marqueur streptomycine porté par la souche étudiée. Néanmoins, si on compare la cinétique d'inactivation de ce marqueur in vivo, à la cinétique de l'action létale du peroxyde, on constate que la vitesse de celle-ci est beaucoup plus grande que celle à laquelle le peroxyde inactive le marqueur Sm.

Cette différence est due sans doute à plusieurs raisons :

Si on considère que l'action létale du peroxyde est due uniquement à sa réactivité sur le génome bactérien, celui-ci constitue une "cible" beaucoup plus grande que celle constituée par le marqueur streptomycine. On peut donc s'attendre à ce que la vitesse d'inactivation du génome dans sa totalité soit beaucoup plus grande que celle de l'inactivation d'une petite partie de celui-ci.

En outre, il est peu probable que l'action létale du peroxyde succinique soit uniquement d'ordre génétique : les modifications variées qu'il est susceptible de faire apparaître sur d'autres constituants cellulaires peuvent provoquer la perte de la viabilité sans même qu'il y ait production d'un dommage génétique. Ceci aurait pour effet d'augmenter encore la disproportion entre l'action létale et l'action inactivante sur un marqueur génétique.

STUY a étudié l'action inactivante in vivo des rayons U. V. et des rayons X sur le même système génétique (même souche d'Hemophilus Influenzae, même marqueur streptomycine) (STUY J. H., thèse de Doctorat, 1961). On peut donc comparer l'action du peroxyde succinique à celle de ces agents (fig. IV-2). Le rapport entre l'action létale sur les bactéries et l'action inactivante sur le marqueur Sm est assez voisin dans le cas des RX et

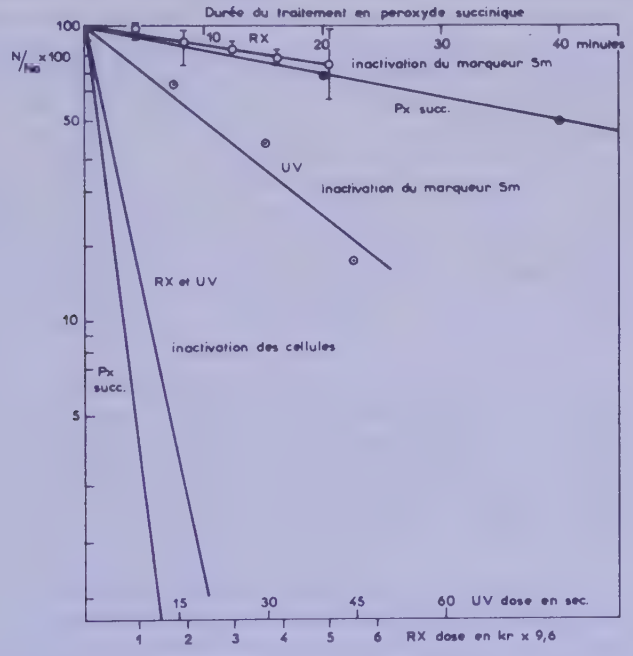


Fig. IV-2 - Comparaison entre l'inactivation du pouvoir transformant d'Hemophilus Influenzae in vivo et in vitro par les RX, les rayons U. V. et le peroxyde succinique (les données sur l'action des RX et des rayons U. V. ont été empruntées à J. H. Stuy, Thèse de doctorat Utrecht, 1961).

du peroxyde succinique, alors qu'en ce qui concerne les rayons U. V. la différence entre la cinétique de l'action létale et de l'action inactivante sur le marqueur Sm est beaucoup moins accentuée. Ceci indique, que l'action du peroxyde succinique comme celle des rayons X est répartie plus uniformément dans la cellule que celle des rayons U. V. qui, eux, sont absorbés spécifiquement par les acides nucléiques : la majeure partie de l'effet létal des deux premiers agents serait due à une action sur des constituants cellulaires autres que l'ADN.

RESUME ET CONCLUSIONS

Nous avons étudié l'inactivation "in vivo" par le peroxyde succinique d'un marqueur génétique porté par l'ADN d'Hemophilus Influenzae et nous avons comparé la cinétique d'inactivation de ce marqueur "in vivo" avec la cinétique de l'action létale de ce peroxyde sur les bactéries : l'inactivation du marqueur étudié est beaucoup plus lente que celle des bactéries.

La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par STUY après action des rayons X et des rayons U. V. sur le même système montre que l'action du peroxyde succinique se rapproche de celle des rayons X et que la majeure partie de son action létale est vraisemblablement due à son action sur des constituants cellulaires autres que l'ADN.

Néanmoins, les expériences décrites dans ce chapitre nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'une action directe du peroxyde succinique sur l'ADN intracellulaire : ces résultats étaient donc l'hypothèse suivant laquelle le peroxyde succinique exerce son effet mutagène par une action directe sur l'ADN intracellulaire.

CHAPITRE V

LE ROLE DES PRÉCURSEURS DES ACIDES NUCLEIQUES DANS LA MUTAGÈNÈSE INDUITE PAR LE PEROXYDE SUCCINIQUE

Si les résultats que nous avons exposés dans les chapitres précédents sont en accord avec l'hypothèse d'un mécanisme d'action mutagène directe du peroxyde succinique sur l'ADN, on ne peut toutefois les considérer comme des preuves de ce mécanisme. Or, nos propres travaux et ceux de SCHWEITZ ont montré que le peroxyde est susceptible d'agir sur les précurseurs de l'ADN, tant bases que nucléotides (M. R. CHEVALLIER, H. SCHWEITZ et D. LUZZATI 1959, D. LUZZATI et coll., 1961). Il était donc nécessaire de déterminer expérimentalement quel pouvait être le rôle éventuel de précurseurs modifiés dans la mutagénèse induite par le peroxyde succinique.

Dans ce but, nous avons tout d'abord réalisé des expériences analogues à celles de DOUDNEY et HAAS (1957) qui ont montré qu'une préincubation de 15 min. des bactéries en présence de pyrimidine avant irradiation ultra-violette permet d'obtenir un nombre sensiblement plus grand de mutants induits qu'en l'absence de préincubation. Des expériences analogues ont par ailleurs indiqué à SZYBALSKI (1959), le rôle joué par la thymidine lors de l'induction, par le triéthylène mélamine (TEM), de mutations conférant à des bactéries streptomycine dépendantes, l'indépendance vis-à-vis de la streptomycine. LORKIEWICZ et SZYBALSKI (1961) ont pu ensuite confirmer le bien fondé des conclusions qu'ils avaient tirés de ces expériences et montrer que c'est principalement la réaction de la TEM sur la thymidine qui est à l'origine de son action mutagène.

En incubant les bactéries en présence de précurseurs, des acides nucléiques *avant* de les soumettre au traitement par le peroxyde, on augmente la teneur du "pool nucléotidique" en précurseurs des acides nucléiques. Si l'action du peroxyde a lieu par l'intermédiaire de ces précurseurs, on doit donc s'attendre à ce que la quantité de mutants induits soit plus grande dans ce cas-là. C'est ce qui a été observé pour les deux agents que nous avons mentionnés dans le paragraphe précédent.

Par contre, en incubant des bactéries en présence de précurseurs des acides nucléiques *après* le traitement par le peroxyde, on peut diminuer la quantité relative des précurseurs modifiés : si c'est la teneur relative des précurseurs modifiés qui détermine leur taux d'incorporation dans l'ADN, on doit alors observer parmi les bactéries ainsi traitées un nombre de mutants inférieur à celui que l'on observe lorsque les bactéries n'ont pas subi de postincubation en présence des précurseurs.

I - EFFET D'UNE PREINCUBATION EN PRESENCE DES PRECURSEURS DES ACIDES NUCLEIQUES SUR LA FREQUENCE DES MUTANTS INDUITS PAR LE PEROXYDE SUCCINIQUE

Dans une série d'expériences, nous avons essayé l'effet éventuel d'une préincubation, 1) en présence d'un mélange équimoléculaire des 4 déoxyribonucléotides et 2) en présence de chacun des 4 déoxynucléosides à la fois. Les résultats que nous avons obtenus au cours de ces expériences figurent sur les tableaux 1 et 2. La préincubation en présence des 4 déoxynucléosides ne modifie que peu, et pas de façon significative, la survie et le nombre des mutants induits, alors que les résultats des préincubations en présence d'un seul des précurseurs à la fois montrent que :

1/ La désoxyadénosine n'a d'effet ni sur la viabilité, ni sur le nombre de mutants induits ;

2/ La désoxyguanosine affecte simultanément la viabilité et la fréquence des mutants induits et produit une légère augmentation du nombre des mutants induits.

3/ La désoxythymidine a des effets peu reproductibles.

4/ La désoxycytidine provoque une légère augmentation de la fréquence des mutants induits.

TABLEAU 1

Action du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-913}

Induction de la mutation réverse Pro^+

1/ Bactéries non préincubées.

2/ Bactéries préincubées en présence d'un mélange des 4 deoxyribonucléosides 10^{-4} M.

Prétraitement	1	2
Survie %	1,0 %	1,0 %
mutants induits/boite	25,6 ± 3,3	31,5 ± 1,2
mutants induits pour 10^6 survivants	17	21
Survie %	25 %	22 %
mutants induits/boite	96 ± 7	94 ± 9,4
mutants induits pour 10^6 survivants	0,96	1,15

La préincubation a été effectuée pendant 20' en présence des 4 déoxynucléosides 10^{-4} M en milieu D sans glucose en l'absence des amino-acides essentiels. On fait suivre le nombre des mutants induits/boite de l'erreur standard $s/\sqrt{n}$.

TABLEAU 2

Action du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-913}

Induction de la mutation réverse Pro^+

1/ Bactéries non préincubées.

2/ Bactéries préincubées en présence de deoxynucléoside 10^{-4} M.

Prétraitement	1	2			
		deoxyadénosine	deoxyguanosine	deoxythymidine	deoxycytidine
Survie	5,8 %	6 %	-	-	-
m_i/boite	93 ± 2,8	37 ± 2,9	-	-	-
m_i p. 10^6 S	15,0	16,8	-	-	-
Survie	1 %	-	0,47 %	0,09 %	0,37 %
m_i/boite	25,6 ± 3,3	-	35,4 ± 4,5	27,4 ± 1,4	16,5 ± 7,3
m_i p. 10^6 S	17	-	*56*	*228*	*33*
Survie	65 %	59 %	31 %	65 %	71 %
m_i/boite	4,3 ± 1,2	1,6 ± 1	10,5 ± 1	5,0 ± 1,6	7,8 ± 1,5
m_i p. 10^6 S	7,5	3,1	*38*	9,0	*12,5*

La préincubation a été effectuée pendant 15 min. à 37° en milieu D sans glucose en l'absence des amino-acides essentiels.

On constate donc que les effets obtenus sont tous ou assez faibles (désoxyguanosine, désoxycytidine) ou peu reproductibles (désoxythymidine).

Cette série d'expérience a été réalisée en préincubant les bactéries en milieu D sans glucose ni facteurs de croissance (thymine, proline, tryptophane). Pensant que ces conditions de préincubations n'étaient peut-être pas les meilleures pour faire augmenter rapidement la teneur du pool intracellulaire en précurseurs de l'ADN nous avons réalisé une deuxième série d'expériences en préincubant les bactéries en présence de thymine tryptophane proline glucose et de désoxynucléotides ou de désoxynucléosides.

Nous avons essayé d'une part l'effet d'une préincubation en présence d'un mélange des 4 désoxynucléotides ou des 4 désoxynucléosides d'autre part, en présence d'acide désoxycytidilique ou de désoxycytidine. Nous avons choisi la désoxycytidine, de préférence aux autres désoxynucléosides car les résultats obtenus in vitro à cette époque indiquaient que la cytosine était plus sensible la désoxycytidine, de préférence aux autres désoxynucléosides car les résultats obtenus in vitro à cette époque indiquaient que la cytosine était plus sensible à l'action du peroxyde succinique que les autres bases de l'ADN.

TABLEAU 3

Action du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-913}

Induction de la mutation réverse Pro^+

1/ Bactéries non préincubées.

2/ Bactéries préincubées en présence d'un mélange des 4 désoxynucléotides (10^{-4} M et 5.10^{-4} M) (II).

3/ Bactéries préincubées en présence d'un mélange des 4 désoxyribonucléosides ($5\ 10^{-4}$ M).

4/ Bactéries préincubées en présence d'un mélange des 4 ribonucléosides.

Exp.	Prétraitement	1	2	3	4
I	Survie	0,37 %	0,15 %	-	0,22 %
	m_i/boite	33 ± 3,2	34 ± 3,2	-	34,3 ± 3,2
	m_i p. 10^6 S	70	180	-	100
II	Survie	33		2,75	-
	m_i/boite	7,2 ± 2		3,2 ± 2,1	-
	m_i p. 10^6 S	0,51		2,7	-

TABLEAU 4

Action du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-913}

Induction de la mutation réverse Pro^+

1/ Bactéries non préincubées.

2/ Bactéries préincubées en présence de désoxycytidine ou d'acide désoxycytidilique ($5\ 10^{-4}$ M).

Prétraitement	1	2	
		Acide désoxycytidylique	Désoxycytidine
Survie	1,9 %	1,9 %	-
m_i/boite	32,6 ± 6,4	48,6 ± 4	-
m_i p. 10^6 S	11,6	17,4	-
Survie	33 %	3,3 %	46 %
m_i/boite	7,2 ± 1,8	16,0 ± 1,4	4,2 ± 1,8
m_i p. 10^6 S	1	22	0,6
Survie	20,9 %	6,2 %	6,2 %
m_i/boite	8,9 ± 1	17,4 ± 1,2	15,4 ± 2,1
m_i p. 10^6 S	1,1	7,2	7,1

La préincubation a été effectuée pendant 15 min. à 37° en milieu D contenant du glucose (1 %) de la thymine (10^{-4} M), du tryptophane (20 µg/ml) et de la proline (20 µg/ml).

Nous avons également examiné l'effet éventuel de ribonucléosides : les résultats que nous avons obtenus sont reportés dans les tableaux 3 et 4. L'effet d'une préincubation en présence d'un mélange des 4 ribonucléosides est analogue à celui que produit une préincubation en présence des 4 désoxyribonucléosides : l'effet est peu net et la reproductibilité est mauvaise. Mais les trois expériences de préincubation en présence d'acide désoxycytidilique montrent un effet net de ce précurseur à la fois sur la viabilité, le nombre et la fréquence des mutants induits, alors que les effets de la désoxycytidine dans les mêmes conditions sont moins reproductibles (tableau 4). Nous avons d'ailleurs constaté que la désoxycytidine est rapidement désaminée par les bactéries et se transforme en désoxyuridine dans le milieu de préincubation. L'existence d'une désaminase spécifique de la cytosine et des nucléosides de la cytosine chez E. Coli est connue et on sait que cet enzyme ne désamine pas les nucléotides de la cytosine. (WANG) Cette désamination est rapide, après 20 min. d'incubation à 37° d'une solution de désoxycytidine 10^{-4} M en présence des bactéries, 78 % de la désoxycytidine est transformée en désoxyuridine. Nous pensons que cette désamination dont la vitesse est susceptible de varier suivant les conditions expérimentales et l'état des cultures est à l'origine de l'irrégularité et de la faible modification de l'intensité de l'action mutagène du peroxyde succinique en présence de désoxycytidine comparativement à celle que l'on observe en présence d'acide désoxycytidilique. Par contre, le préincubation en présence d'acide désoxycytidilique affecte de façon significative à la fois viabilité et la mutabilité induite par le peroxyde succinique.

II - EFFET D'UNE INCUBATION EN PRESENCE DES 4 DESOXYNUCLEOSIDES, APRES LE TRAITEMENT DES BACTERIES PAR LE PEROXYDE SUCCINIQUE, SUR L'ACTIVITE LETALE ET MUTAGENE DE CE DERNIER

Les résultats obtenus en préincubant les bactéries avec des désoxynucléotides ont montré une action de certains de ceux-ci sur l'intensité de l'action létale et mutagène du peroxyde succinique. Dans l'hypothèse où une grande partie des effets du peroxyde soit due à son action sur les précurseurs nucléotidiques normalement présents, on devrait pouvoir reverser cet effet en postincubant des bactéries traitées par le peroxyde succinique en présence de désoxynucléosides ou de désoxynucléotides.

Nous avons donc postincubé des bactéries traitées par le peroxyde succinique dans des milieux contenant des nucléotides afin d'étudier leur action sur la viabilité et la mutabilité des bactéries.

Dans le tableau 5, nous avons groupé les résultats obtenus lors des expériences de postincubations avec des mélanges des désoxynucléotides, désoxynucléosides et ribonucléosides. En incubant en présence des désoxyribonucléotides, on observe une restauration de la viabilité et parallèlement une diminution de la fréquence des mutants induits, mais le nombre absolu de mutants change peu. En présence de ribonucléotides, on observe un effet analogue dans une expérience, et dans l'autre une diminution significative du nombre des mutants induits accompagné d'un faible changement de leur fréquence.

Il semble donc d'après cette série d'expérience que l'incubation en présence des 4 désoxynucléotides a un effet restaurateur sur la viabilité des bactéries traitées par le px. succinique et affecte de la sorte la fréquence

TABLEAU 5

Action du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-913}

Effet de la Postincubation des bactéries traitées par le peroxyde succinique en présence de précurseurs des acides nucléiques sur l'induction des mutations réverses Pro^+

	Post-traitement	0	Milieu D	4 désoxyribo-nucléotides	4 ribonu-cléotides
	Survie	0,036 %	0,051 %	0,32 %	0,21 %
I	m_i/boite	162 ± 10	116 ± 5	120 ± 9	125 ± 7,5
	m_i p. 10^8 S	1700	610	141	230
	Survie	6 10^{-3} %	8,6 10^{-2} %	0,11 %	7 10^{-2} %
II	m_i/boite	122	117 ± 6	103 ±	88 ±
	m_i p. 10^8 S	3040	206	132	187
	Survie	0,32	0,64	0,64	-
III	m_i/boite	48,7 ± 3,4	45 ± 2,3	45,6 ± 5,2	-
	m_i p. 10^8 S	450	210	210	-

1) On postincube en présence des précurseurs pendant 15 min, puis on centrifuge les bactéries et on les étale sur les boites de gélose de sélection et de numération.
2) Le milieu de postincubation contient les précurseurs en concentration équimoléculaires 10^{-4} M et de la thymine 10^{-4} M, du tryptophane 40 µg/ml, de la proline 40 µg/ml et du glucose 1 %, exp. I, exp. II, de la thymine et du glucose sans amino-acides essentiels exp. III.

des mutants induits, mais il est frappant de constater que le nombre de mutants observés ne change pas, que l'on postincube en milieu D sans précurseurs des A.N. ou en milieu contenant des précurseurs.

En conclusion, ces deux séries d'expériences indiquent :

1/ que l'augmentation de la teneur en certains précurseurs des acides nucléiques dans le milieu interne des bactéries avant leur traitement par le px. succinique augmente son activité mutagène et son action létale à des degrés divers

2/ que l'augmentation de cette teneur après le traitement des bactéries par le peroxyde a seulement un effet restaurateur sur la viabilité.

Ces résultats ne sont donc qu'en accord partiel avec ce que l'on peut prévoir dans le cas d'une action indirecte du peroxyde succinique. Néanmoins, ils indiquent que les précurseurs des acides nucléiques présents dans le milieu interne des bactéries ont une influence sur l'action létale et mutagène du peroxyde succinique.

III - ACTION DU PEROXYDE SUCCINIQUE SUR LE POOL NUCLEOTIDIQUE DES BACTERIES

Afin d'essayer de préciser par quel mécanisme les précurseurs des acides nucléiques intracellulaires sont susceptibles d'intervenir lors de l'action du peroxyde sur les bactéries, nous avons cherché à déceler une action du peroxyde sur le "pool nucléotidique" normalement présent chez les bactéries.

L'absorption à 260 mμ de l'extrait bactérien acido-soluble réflète la teneur globale en composés nucléotidiques de ce pool. Une diminution de cette absorption mesurée sur des extraits de parties aliquotes de bactéries témoins et des bactéries peroxydées indiquerait donc l'existence d'une dégration par le peroxyde de certains composés de ce pool.

Nous avons donc mesuré l'absorption à 260 mμ d'extraits acido-solubles à froid préparés à partir de quantités égales de bactéries témoins et de bactéries traitées par le peroxyde succinique à la concentration de 10^{-4} g/ml pendant 60 min. (tableau 6).

TABLEAU 6

Absorption à 260 mμ des extraits bactériens acido-solubles rapportées à une unité de DO. de culture

Mesure de la DO. des cultures effectuées à 650 mμ dans un colorimètre Electrosynthèse

Exp.	DO. à 260 mμ de l'acido-soluble	
N°	Extrait de bactéries témoins	Extrait de bactéries traitées
1	1,84	1,16
2	0,86	0,73
3	0,51	0,44
4	1,72	1,55
5	0,62	0,56
6	0,74	0,55
7	0,52	0,70
8	0,58	0,64

Une analyse de la variance de ces résultats montre que ces différences ne sont pas significatives. Toutefois, au cours d'une expérience où nous avons traité les bactéries avec une concentration de peroxyde 5 fois supérieure, nous avons décelé une diminution significative de l'absorption U. V. à 260 mμ de l'extrait acido-soluble. On peut en conclure que le peroxyde dans les conditions habituelles de traitements ne modifie pas quantitativement le pool nucléotidique. En outre on n'observe pas de modifications des rapports de la D. O. à $\frac{230}{260}$ mμ et à $\frac{280}{260}$ mμ, mais on ne peut exclure toutefois l'apparition due à l'action du peroxyde succinique, de modifications qualitatives de certains de ces composés. Néanmoins, une analyse des composés nucléotidiques de l'acido-soluble étant difficile à mener à bien, tant quantitativement que qualitativement, nous ne l'avons pas entreprise, mais par contre nous avons entrepris d'isoler "in vitro" des dérivés de peroxydation des nucléosides et des nucléotides afin d'essayer leur action mutagène éventuelle sur les bactéries.

En effet, si l'action mutagène du peroxyde avait lieu par l'intermédiaire de composés peroxydés provenant du pool nucléotidique tels que des dérivés de l'acide désoxycytidilique par exemple, on pouvait espérer reproduire les effets mutagènes du peroxyde succinique en incubant les bactéries en présence de dérivés de peroxydation isolés "in vitro" et éviter ainsi lors du traitement des bactéries la production des effets du peroxyde qui ne seraient pas en relation directe avec son action mutagène (en particulier, une partie au moins de son action létale).

En outre, l'éventuelle mise en évidence par ce moyen de l'action mutagène de dérivés des bases nouveaux, aurait présenté en elle-même un intérêt évident.

IV - ISOLEMENT ET PROPRIETES DE DERIVES DE PEROXYDATION DES PRECURSEURS DE L'ADN PREPARES IN VITRO

1 - Action du peroxyde succinique sur les bases puriques et pyrimidiques.

Nous avons tout d'abord étudié l'action du peroxyde succinique sur la cytosine dans différentes conditions expérimentales : nous avons traité la cytosine à la concentration finale de 7.10^{-5} M par du peroxyde succinique à la concentration finale de 1 mg/ml soit $4,3.10^{-3}$ M ; 1) en solution dans de l'eau distillée, le pH de la solution est alors voisin de 3 ; 2) en solution dans du ClNa 0,07 M, le pH de la solution après 24 heures à 37° est légèrement supérieur à 3 ; 3) en tampon phosphate 0,1 M pH 7 (sans ClNa). Les résultats de mesures de l'absorption U. V. à 260 mμ pratiquées sur ces différentes solutions (tableau 7) montrent que la quantité de cytosine disparue après 24 heures à 37° dépend à la fois du pH et de la nature des ions présents dans les solutions.

TABLEAU 7

Action du peroxyde succinique sur la cytosine

% de cytosine disparue après 24 h à 370		
pH 3	pH 3 + ClNa	pH 7 sans ClNa
20,6	76,5	88
21,4	-	-

Nous avons donc étudié par la suite, l'action du peroxyde succinique par les précurseurs de l'ADN en l'absence de ClNa et à pH défini.

L'étude comparée de son action sur la cytosine, la thymine, l'adénine et la guanine a montré qu'à pH 7 et dans le domaine de concentrations utilisées (peroxyde 1 mg/ml soit $4,32.10^{-3}$ M, base entre 5.10^{-5} et 10^{-4} M, soit un rapport de concentration moléculaire peroxyde/base compris entre 86 et 43), la cytosine est de beaucoup la plus attaquée des quatre bases étudiées. En outre, nous avons observé que le spectre d'absorption des solutions d'adénine traitées par le peroxyde succinique dans ces conditions présente une augmentation importante d'absorption aux environs de 230 mμ

Ainsi, dans ces conditions, le peroxyde transforme une partie importante des bases, soit en dérivés qui n'absorbent plus dans cette région du spectre,

soit en dérivés dont les caractéristiques d'absorption sont modifiées de telle sorte que l'on observe des changements des spectres d'absorption initiaux.

2 - Désoxyribonucléotides et désoxyribonucléosides.

Afin d'obtenir des quantités isolables des éventuesl dérivés de peroxydation des désoxynucléosides et des désoxynucléosides, nous avons réalisé des expériences dans des conditions expérimentales différentes de celles que nous avons employées pour étudier l'action du peroxyde sur les bases. Nous avons traité les désoxynucléotides à la concentration de 3.10^{-3} M par du peroxyde succinique respectivement 1,15 et $0,45.10^{-3}$ M dissous en tampon phosphate 0,05 M. Dans ces conditions, nous avons pu isoler de l'acide désoxyadénylique 1 N oxyde, ainsi que de l'acide désoxycytidilique 1 N oxyde en quantité appréciable. Nous avons isolé ces dérivés après chromatographie sur papier de parties aliquotes de solution traitée (tableau 2) et nous les avons caractérisés par leur spectre d'absorption qui diffère notablement de ceux des composés qui leur donnent naissance (fig. V-1 et V-2, tableau 8).

TABLEAU 8

	max 1 mμ	max 2 mμ	ε max 1	ε max 2	Rf solvt.
dAMP	261	-	$14,5.10^{3}$ (2)	-	0,26 (4)
dAMP 1 N oxyde	232,5	261	$40,8.10^{3}$ (1)	$9,4.10^{3}$ (2)	0,18 (4)
dCMP	271	-	$9,1.10^{3}$ (1)	-	0,23 (4)
dCMP 1 N oxyde	224	271	$19,5.10^{3}$ (1)	$5,4.10^{3}$ (2)	0,13 (4)
désoxyadénosine	260	-	$14,9.10^{3}$ (1)	-	0,69 (4)
désoxyad. 1 N oxy.	232,5	260	$40,8.10^{3}$ (1)	-	-

(1) CRAMER et SEIDEL, CRAMER, RANDERATH et SCHAFER, BBA, 1963.
(2) valeurs déterminées par nous-mêmes.
(3) d'après Pabst Laboratories, Edition de 1961.
(4) valeurs déterminées par nous-mêmes, nettement inférieures à celles obtenues par STEVENS, SMITH et BROWN, sans doute en raison de légères variations dans le dispositif expérimental utilisé. (J. of the Am. Chem. Soc. 1959, vol. 81, 1734).

En mesurant l'absorption U. V. à plusieurs longueurs d'ondes en fonction du temps dans les solutions traitées nous avons pu suivre l'apparition de ces deux composés et montrer ainsi que la transformation de l'acide désoxyadénylique en acide désoxyadénylique 1 N oxyde peut atteindre 95 % de la quantité initiale d'acide désoxyadénylique alors que celle d'acide désoxycytidilique en acide désoxycytidilique 1 N oxyde n'atteint que 65 % de la quantité d'acide désoxycytidilique initialement présente (fig. V-3 et V-4).

Par contre, après traitement dans ces mêmes conditions de l'acide désoxyguanylique et de l'acide thymidilique, nous n'avons pas pu déceler l'apparition de taches nouvelles après chromatographie, ni de variation de l'absorption U. V. des solutions traitées.

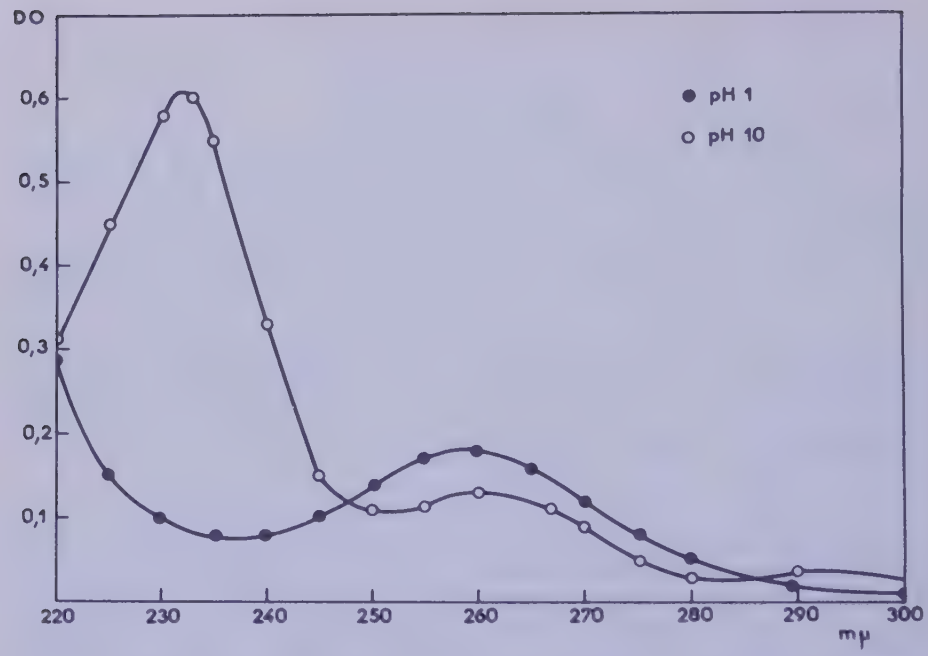


Fig. V-1 - Spectre d'absorption U. V. de la désoxyadénosine 1 N oxyde isolée après le traitement de la désoxyadénosine par le peroxyde succinique (conditions de traitement dans le texte), chromatographie en eau ammoniacale (pH 10).

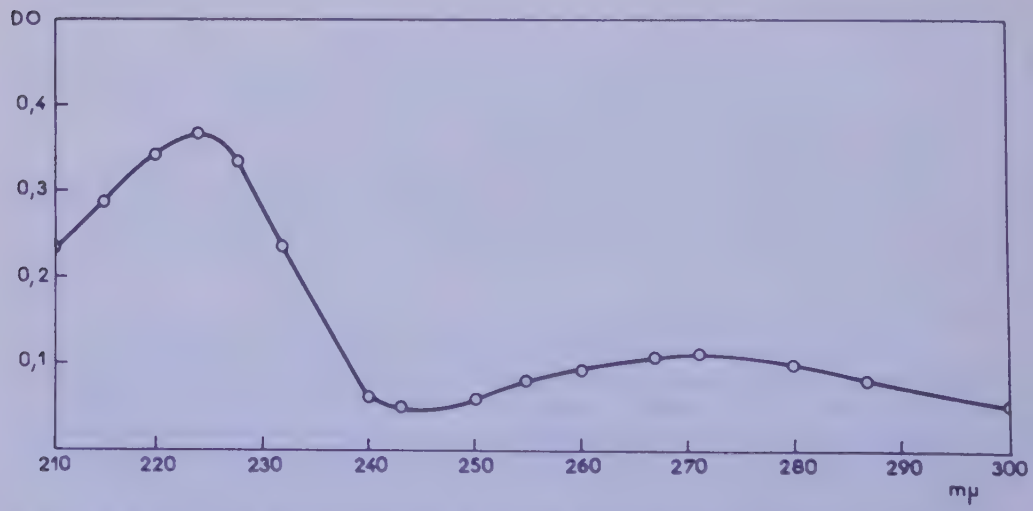


Fig. V-2 - Spectre d'absorption U. V. de la désoxycytidine 1 N oxyde isolée après traitement de la désoxycytidine par le peroxyde succinique (conditions de traitement dans le texte et solvant chromatographique dans le tableau 9).

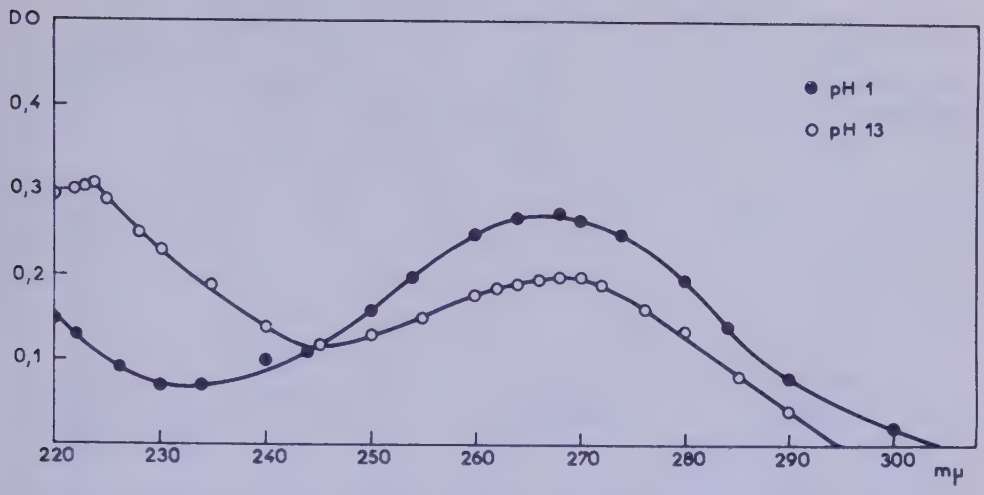
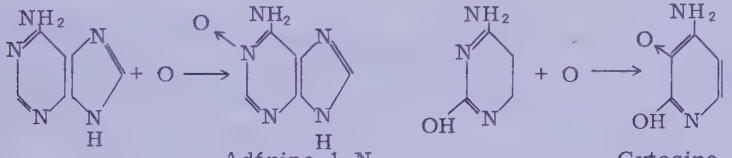


Fig. V-3 - Dérivé de peroxydation de la thymidine. (conditions de traitement et solvant chromatographique dans le texte et tableau 9).

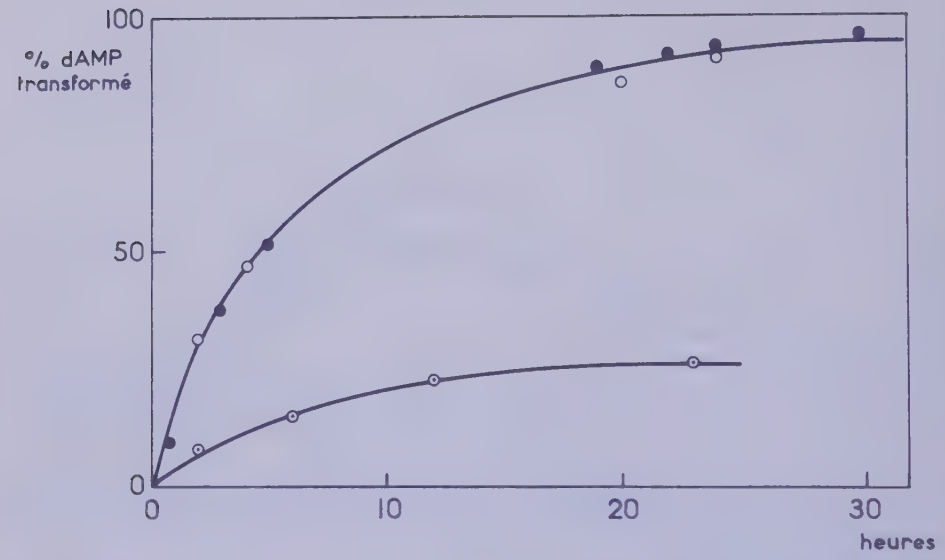
Nous avons réalisé des expériences analogues avec les désoxynucléosides et pu isoler également à partir de ceux-ci de la désoxyadénosine 1 N oxyde et de la désoxycytidine 1 N oxyde. En concentrant les solutions de thymidine traitées par le peroxyde succinique dans les mêmes conditions, nous avons pu isoler un dérivé de peroxydation de la thymidine (tableau 9 et figure V-3) qui n'a pas été identifié, mais dont la teneur dans les solutions ne dépasse pas 1 % de la quantité de thymidine initialement présente. Ce dérivé pourrait être un N-oxyde de la thymine : il a en fonction du pH un comportement spectral qui se rapproche de celui de l'adénine-1 N oxyde.



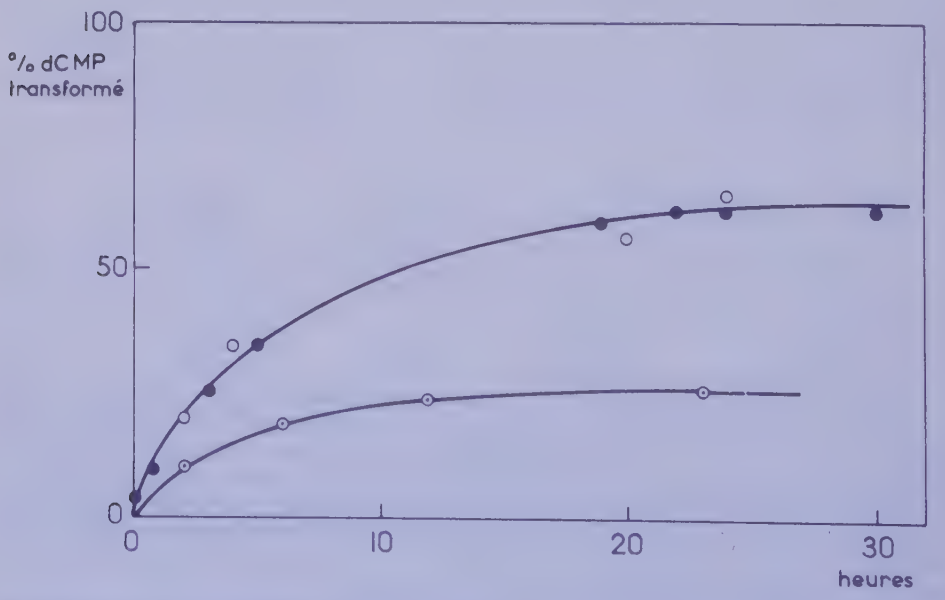
Adénine — Adénine 1 N oxyde — Cytosine — Cytosine 1 N oxyde

Ainsi, lorsque le rapport des concentrations moléculaires peroxyde succinique/base est grand (> 40) le peroxyde succinique agit essentiellement en détruisant les bases ou les nucléotides (sauf en ce qui concerne l'adénine : l'augmentation de l'absorption à 230 mμ des solutions traitées par le peroxyde succinique étant vraisemblablement due à la formation d'adénine 1 N oxyde), alors que lorsque le rapport des concentrations moléculaires peroxyde/base est voisin de 4, il oxyde *quantitativement* et *sélectivement* l'acide désoxyadénylique et l'acide désoxycytidilique en 1 N oxyde.

Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus récemment par CRAMER et SEIDEL (1963 a) et CRAMER, RANDERATH et SCHAFER (1963 b) qui ont oxydé sélectivement le dAMP et dCMP en 1 N oxyde au moyen d'acide perperphtalique.



Transformation du dAMP en désoxyadénosine 1 N oxyde monophosphate en fonction de la durée du traitement par le peroxyde succinique. Rapport des concentrations peroxyde/nucléotide : courbe supérieure 4,4 ; courbe inférieure 2,4.



Transformation du dCMP en désoxycytidine 1 N oxyde monophosphate en fonction de la durée du traitement par le peroxyde succinique rapport des concentrations Peroxyde/nucléotide : courbe supérieure : 4,3 ; courbe inférieure : 1,9.

Fig. V-4

TABLEAU 9

Analyse chromatographique des produits de peroxydation des désoxyribonucléotides et des désoxyribonucléosides

Solvant	1	2	3	4	5	6
TdR	0,78	0,73	0,40	0,83	-	-
TdR-Px	0,78	0,70	*0,06* 0,40	0,83	-	-
TMP	-	-	-	-	0,65	0,38
TMP-Px	-	-	-	-	0,67	0,38
CdR	0,77	0,62	-	0,62	-	0,64
CdR-Px	0,73 *0,69*	0,62 *0,49*	-	0,62	-	-
dCMP	-	-	-	-	0,70	0,23
dCMP-Px	-	-	-	-	0,74	0,23 *0,13*
AdR	0,53	0,64	-	-	-	0,69
AdR-Px	*0,38* 0,53 0,71(1)	0,64 *0,74*	-	-	-	-
dAMP	-	-	0,0	-	0,36	0,26
dAMP-Px	-	-	0,0	-	0,36 *0,56* *0,62*	0,36(2) 0,28 *0,18*
GdR		0,52	0,07	-	-	0,57
GdR-Px		0,51	0,06	-	-	-
dGMP	-	-	-	-	-	0,17
dGMPx	-	-	-	-	0,44	0,16

(1) la tache qui a un rf de 0,71 n'apparaît que lorsqu'on chromatographie des quantités très importantes de solutions.
(2) le spectre de cette tache après élution est très voisin de celui du dAMP, nous ne l'avons trouvée qu'une fois.

Solvants utilisés.

1) H_2O ajusté à pH 10 avec NH OH_4N (descendant ; W_1).
2) n-butanol-alcool tétrahydrofurfurylique citrate de 0,08 M - (2/1/1) (descendant ; W_1).
3) n-butanol saturé d'eau - NH_3 85 % vol. de n-butanol
15 % vol. de H_2O :
NH_4 OH 14,3 N 1 ml (W_1. descendant)
4) isopropanol 81 ml - HCl, 21,6 ml - compléter à 130 ml avec H_2O (descendant ; W_1).
5) $SO_4(NH_4)_2$ saturé 800 ml - CH_3COO Na N 180 ml - isopropanol 20 ml (ascendant ; W_1).
6) $SO_4(NH_4)_2$ 1 % isopropanol (1V/2V) (ascendant ; W_1) ; dans ce solvant, les rf sont souvent variables, étant donné le faible pouvoir tampon du $(SO_4(NH_4)_2$ (M. A. STEVENS, H. W. SMITH, G. B. BROWN, J. Am. Chem. Soc., 1959, vol. 81, p. 1734).

V - ETUDE DE L'ACTION MUTAGENE DES DERIVES DE PEROXYDATION DES PRECURSEURS DE L'ADN QUE NOUS AVONS ISOLE

Nous décrirons ici les expériences réalisées pour mettre en évidence une éventuelle action mutagène des produits que nous avons isolé, à savoir la désoxyadénosine 1 N oxyde, la désoxycytidine 1 N oxyde, le dérivé non identifié obtenu à partir de la thymidine, l'acide désoxyadénylique 1 N oxyde et l'acide désoxycytidilique 1 N oxyde.

Pour cela nous avons incubé parallèlement des suspensions de bactéries en milieu D (témoin) et des suspensions de bactéries en milieu D contenant en outre le produit à l'essai.

Nous nous sommes placés dans différentes conditions expérimentales :

1/ Dans une série d'expériences, nous avons utilisé les mêmes conditions expérimentales que celles employées lors du traitement des bactéries par le peroxyde succinique, c'est-à-dire que nous avons incubé les bactéries en milieu D non supplémenté en glucose et facteurs de croissance (0 glucose, 0 thymine, 0 tryptophane, 0 proline).

2/ Dans une deuxième série d'expériences, nous avons recherché l'existence d'un effet mutagène éventuel dans des conditions où une synthèse d'ADN est encore possible, c'est-à-dire en présence de thymine et glucose.

Les concentrations utilisées lors de ces essais étaient de l'ordre de 5.10^{-5} M pour les dérivés de l'adénine et de la cytosine, de l'ordre de 10^{-5} M pour le dérivé de la thymidine(*).

L'1 N oxyde de la désoxyadénosine que l'on obtient le plus facilement et celui de l'acide désoxyadénylique ont été essayé respectivement trois fois et une fois, le désoxycytidine 1 N oxyde a été essayé deux fois, le dérivé de la thymidine une fois. Dans aucune de ces expériences nous n'avons pu observer l'apparition de mutants induits, ni la production d'une action létale sur les bactéries, quelles qu'aient été les conditions expérimentales utilisées (voir tableau 10 et 11). Ultérieurement, ayant à notre disposition de l'adénosine 1 N oxyde (produit commercial), nous avons essayé de déterminer si ce composé était capable de se substituer à l'adénine lors de la croissance d'un mutant de E. Coli B, incapable de synthétiser l'adénine. Nous avons pu constater que la transformation de l'adénosine 1 N oxyde en adénosine n'a pas lieu spontanément dans les conditions utilisées pour faire croître les bactéries, mais que néanmoins l'adénosine 1 N oxyde peut remplacer l'adénine et permettre la croissance de ce mutant. Le temps de division des bactéries B_{14} Ad^- en milieu synthétique est de 80 min. en présence d'adénosine 1 N oxyde au lieu de 60 min. en présence d'adénosine ; mais l'adénosine 1 N oxyde ne semble pas jouer le rôle *d'analogue*, puisque les bactéries cultivées en présence de mélange d'adénosine + adénosine 1 N oxyde ont un temps de division de 60 min. quel que soit le rapport des concentrations respectives d'adénosine et d'adénosine 1 N oxyde. Il semblerait donc que l'adénosine 1 N oxyde soit plutôt utilisée après retransformation en adénine par un processus enzymatique qui déterminerait la vitesse de croissance des bactéries. Des

---

(*) Si on suppose que le coefficient d'absorption moléculaire de ce dérivé est du même ordre de grandeur que celui de la thymidine.

études sur l'action de l'adénosine 1 N oxyde et de l'adénine 1 N oxyde sur la croissance de cellules d'ascites d'Ehrlich ont également amené FREDERIKSEN et KLENOW (1960) à conclure que l'action biologique de l'adénine 1 N oxyde ou de l'adénosine 1 N oxyde était liée à la transformation de l'1 N oxyde en adénine ou en adénosine et à l'effet inhibiteur exercé par l'excès de ces composés sur la croissance du système étudié. Il ne semble donc pas que l'adénosine 1 N oxyde soit doué de propriétés biologiquement particulièrement intéressantes.

TABLEAU 10

Action des dérivés de peroxydation obtenus in vitro sur E. Coli 15 T^{-913}

1/ Traitement en milieu D sans supplément.

N° Exp	Produit essayé	durée du traitement		Bact/b. à la fin du traitement	Mut/b. à la fin du traitement
1	d. AMP peroxydé (1 N oxyde)	75 min	Témoin	$1,1\ 10^8$	10,5
			traité	$1,3\ 10^8$	10,5
2	d. AMP peroxydé (1 N oxyde)	60	Témoin	$7,8\ 10^7$	63,3
			traité	$6,6\ 10^7$	59,4
3	d Adénosine peroxyde (1 N oxyde)	60	Témoin	$1,7\ 10^8$	106
			traité	$1,4\ 10^8$	95
4	d. Ad. peroxydé (1 N oxyde)	60	Témoin	$6,0\ 10^7$	78
			traité	$6,5\ 10^7$	80
5	d. Ad. peroxydé (1 N oxyde)	150	Témoin	$5,4\ 10^7$	82,5
			traité	$4,2\ 10^7$	81,1
6	d. Cyt. peroxydé (1 N oxyde)	60	Témoin	$7,2\ 10^7$	68,2
			traité	$1,0\ 10^8$	44,2
7	d. Cyt. peroxydé (1 N oxyde)	150	Témoin	$5,4\ 10^7$	81,0
			traité	$4,2\ 10^7$	82,5
8	d. Thymidine peroxydé	30	Témoin	$4,7\ 10^7$	22,5
			traité	$4,6\ 10^7$	32,5

TABLEAU 11

2/ Traitement en milieu D + Thymine + Glucose.

	Produit essayé	durée du Traitement		Bact/b. à la fin du traitement	Mut/b. à la fin du traitement
1	d AMP	60 min	Témoin	$6,7\ 10^7$	20,6
	peroxydé		traité	$8,0\ 10^7$	19,5
2	d AMP	150 min	Témoin	$3,8\ 10^7$	82,7
	d AMP peroxydé		traité	$4,8\ 10^7$	82,0
	d CMP péroxydé	150 min	traité	$4,8\ 10^7$	88,0

3/ Traitement en milieu D + Thymine + Glucose + 0,2 µg/ml de Tryptophane et de Proline.

	Produit essayé	durée du Traitement		Bact/b. à la fin du traitement	Mut/b. à la fin du traitement
1	d AMP	60 min	Témoin	$7\ 10^7$	90
	peroxydé		traité	$7,3\ 10^7$	86

Les résultats négatifs que nous avons obtenus en essayant l'activité mutagène de dérivés d'oxydation des précurseurs de l'ADN pouvaient toutefois être imputables au fait que lors de nos essais nous n'avions utilisé que des dérivés de peroxydation des désoxynucléosides (exception faite d'une expérience en présence d'acide adénylique 1 N oxyde).

Nous avions utilisé ces dérivés parce que les expériences de ROBERTS et coll. (1957) ont montré que chez Escherichia Coli, seule la fraction nucléosidique des nucléotides exogènes est utilisée pour la synthèse des acides nucléiques et que les nucléosides sont de meilleurs compétiteurs isotopiques que les nucléotides.

Toutefois, à l'heure actuelle, on n'est pas certain que la déphosphorylation qui a lieu au moment de la pénétration, soit totale, ce qui est certain c'est qu'il y a un échange rapide de phosphore à l'intérieur de la cellule. BARKER et coll. (1961) ont montré que chez Candida Utilis lorsqu'on suit l'incorporation d'orthophosphate p^{32}, la présence d'adénosine 5' di- et triphosphate est capable de supprimer cette incorporation dans le résidu de l'adénosine 5' monophosphate du RNA, l'adénosine monophosphate au contraire est sans effet. Dans le cas où les dérivés de peroxydation soient de mauvais substrats, soit pour les nucléosides kinases dont la spécificité est notoire (KORNBERG, 1958), soit pour les pyrophosphorylases, on pourrait penser qu'il serait préférable d'utiliser pour ces expériences des dérivés de peroxydation di- ou triphosphorylés. En outre, LICHTENSTEIN, BARNER et COHEN (1960) ont montré que la moitié nucléosidique du thymidilate et du déocytidilate exogène

est utilisées telle quelle pour la formation du thymidilate bactérien, alors que la désoxycytidine exogène n'est pas utilisée telle quelle et que son résidu désoxyribose ne se retrouve pas dans l'ADN : effectivement, le 5 fluoro désoxycytidine 5'P a un effet bactéricide prolongé par rapport au 5 fluorouracile désoxyriboside.

Ces considérations nous ont paru justifier la reprise de nos essais à partir de solutions de désoxynucléotides triphosphates dont nous disposions, et que nous avons donc traité par du peroxyde succinique.

Essai de l'activité de désoxynucléotides triphosphates peroxydés.

Nous avons testé l'action mutagène éventuelle de ces solutions sans les chromatographier au préalable. En effet, LORKIEWIEZ et SZYBALSKY ont signalé (1961) que dans le cas de mélanges mutagènes de triéthylène mélamine (TEM) et de pyrimidine après chromatographie, il y avait perte du pouvoir mutagène des constituants du mélange alors que ce mélange est normalement plus mutagène que la solution de TEM seule : la chromatographie provoque la perte du composé mutagène qui est formé par la réaction de la TEM avec la thymidine. Nous avons pensé que le peroxyde succinique pouvait peut-être également provoquer la formation de dérivés mutagènes labiles.

Nous avons donc peroxydé les désoxynucléotides triphosphates dans les conditions suivantes :

4 ml de solutions d'1 désoxynucléotides sont mélangés à 4 ml de solution de peroxyde succinique à 2.10^{-3} g/ml en tampon phosphate 0.2 M. On laisse incuber ce mélange pendant 48 h à 37° C puis à 4° et on dose l'eau oxygénée formée lors de la décomposition du peroxyde et restant dans les solutions.

Nous avons étudié l'activité mutagène de ces solutions en incluant des contrôles qui contiennent de l'H_2O_2 afin d'être en mesure de distinguer le rôle éventuel de l'eau oxygénée lors de ces expériences. La normalité de l'eau oxygénée des différentes solutions était de $1,1.10^{-3}$ N et $3,5.10^{-4}$ N en dGTP et dATP et les contrôles étaient respectivement $1,1.10^{-3}$ N et $3,5.10^{-4}$ N.

Les bactéries incubées pendant 30 min à 37° en présence de ces différentes solutions de nucléotides triphosphates peroxydés ne présentent pas de modification de viabilité et il n'y a pas d'apparition de mutants induits (tableau 12).

Nous en concluons donc que les nucléotides triphosphates traités par le peroxyde succinique ne sont pas doués de propriétés mutagènes.

Ainsi tous les essais que nous avons tentés afin de mettre en évidence un mécanisme d'action mutagène indirecte du peroxyde succinique par l'intermédiaire de dérivés anormaux des précurseurs de l'ADN se sont révélés infructueux.

TABLEAU 12

Action des désoxyribonucléotides triphosphates peroxydés sur E. Coli 15 T^{-913}

Durée du traitement	Produit essayé	Nb. bact/ml. à la fin du traitement	Mut/b. à la fin du traitement
30 min	d CTP + Px	$7,4\ 10^6$	15,9
	d TTP + Px	$6,7\ 10^6$	15,3
	Px seul	$7,6\ 10^6$	15,3
	témoin	$8,8\ 10^6$	13,0
30 min	d ATP + Px	$8,5\ 10^6$	12,4
	d GTP + Px	$8,4\ 10^6$	9,0
	témoin	$7,5\ 10^6$	8,4
90 min	mélange des 4 désoxyribonucléotides triphosphate + Px	$4,2\ 10^7$	15,2
	témoin	$4,2\ 10^7$	21

DISCUSSION

Nous avons cherché à mettre en évidence l'existence d'un mécanisme d'action mutagène indirecte du peroxyde succinique. Dans ce but, nous avons étudié tout d'abord l'effet, sur la fréquence des mutations induites par le peroxyde succinique, d'un "remplissage" du pool acido-soluble, en précurseurs désoxynucléosidique et désoxynucléotidique soit avant, soit après la peroxydation des bactéries. Nous avons trouvé qu'une préincubation des bactéries en présence d'acide désoxycytidilique affecte simultanément et la viabilité des bactéries traitées et la fréquence des mutants induits. En effet, les bactéries préincubées en présence d'acide désoxycytidilique sont plus sensibles à l'action létale du peroxyde succinique que celles qui n'ont pas subi de préincubation, et la fréquence avec laquelle le peroxyde succinique induit des mutations est également plus grande lorsque les bactéries ont été préincubées en présence d'acide désoxycytidilique que lorsqu'elles ne l'ont pas été. L'effet des préincubations en présence d'autres précurseurs est peu net.

L'addition de précurseurs nucléotidiques après le traitement par le peroxyde a un effet restaurateur à la fois sur la viabilité et sur la fréquence des mutants induits.

Au cours de l'analyse de la teneur globale en composés nucléotidiques de "pool-soluble" de bactéries témoins et de bactéries peroxydées, nous n'avons pas pu déceler de variation quantitative de la teneur en composés nucléotidiques de ce "pool" après l'action du peroxyde. Cela n'exclut pas toute-

fois que le peroxyde succinique ne soit susceptible de produire in vivo la formation des composés (tels les N_1 oxyde de purines ou pyrimidines) dont l'absorption à 260 mμ est à peine inférieure à celles des composés normaux qui leur donnent naissance.

L'étude de l'action mutagène éventuelle de dérivés de peroxydation produits in vitro et in vivo parmi les composés nucléotidiques du pool acido-soluble s'est également révélée négative : en effet, ni les dérivés de peroxydation des désoxynucléosides et des désoxynucléotides isolés "in vitro", ni les désoxynucléotides triphosphates peroxydés n'ont d'action mutagène sur les bactéries dans aucune des conditions que nous avons employées pour tenter de déceler cette action.

Ainsi, étant donné les différents résultats que nous venons de rapporter lors de l'étude de l'action du peroxyde sur les bactéries, (action du peroxyde succinique sur l'ADN d'Hemophilus influenzae in vivo, pas d'action mutagène des dérivés de peroxydations produits in vitro) et ceux obtenus par SCHWEITZ lors de l'étude de l'action du peroxyde succinique sur l'ADN in vitro qui montrent que le peroxyde succinique agit essentiellement sur les hétérocycles des bases puriques et pyrimidiques des bases de l'ADN sans cliver les liaisons phosphoesters (LUZZATI, SCHWEITZ et coll. (1961)), nous pensons pouvoir conclure que l'action mutagène du peroxyde succinique a lieu par une action de celui-ci sur les bases de l'ADN intracellulaire.

Nous pensons que l'effet des préincubations en présence d'acide désoxycytidylique qui, seul pourrait être en accord avec l'hypothèse d'un mécanisme d'action mutagène indirecte du peroxyde, peut être explicable même dans un mécanisme d'action mutagène directe et ceci de deux façons au moins :

1/ La présence d'un excès d'acide désoxycytidilique pourrait avoir une action particulière sur la régulation de la biosynthèse de l'ADN qui favoriserait par ce moyen une action létale et mutagène plus intense du peroxyde succinique en sa présence. On sait en effet que des excès de thymidine, de désoxyguanosine, de désoxyadénosine sont susceptibles d'inhiber la croissance de certaines cellules (LARK, 1960, KLENOW, 1959) en empêchant la synthèse de l'ADN. On n'a pas mentionné l'existence d'effet similaire de la désoxycytidine ou de l'acide désoxycytidilique, néanmoins, tous les mécanismes susceptibles d'intervenir dans la régulation de la biosynthèse de l'ADN sont loin d'être encore connus et il est concevable que la création d'un déséquilibre du pool nucléotidique puisse influencer la biosynthèse de l'ADN.

2/ La présence d'un excès d'acide désoxycytidilique pourrait également agir par un mécanisme assez différent ; dans l'hypothèse d'un mécanisme d'action mutagène directe du peroxyde succinique, on suppose que celui-ci agissant directement sur l'ADN produit "in situ" des dérivés modifiés des bases ; l'appariement de ces dérivés pourrait être moins spécifique que celui des bases naturelles ; dans ces conditions, il est normal qu'une modification de la composition du pool nucléotidique puisse avoir une influence sur la probabilité d'appariement de ces bases modifiées in situ. Dans cette hypothèse, le fait que seule la présence d'acide désoxycytidilique ait une action sur l'intensité de l'effet mutagène du peroxyde succinique suggère que seul un appariement de la base modifiée in situ avec l'acide désoxycytidilique est mutagène, ce qui exclurait une modification in situ de la guanine comme étant à l'origine de l'effet mutagène du peroxyde dans le cas de la mutation $Pro^- \longrightarrow Pro^+$ que nous avons étudiée. Cet effet unique de la présence de

l'acide désoxycytidylique est d'ailleurs en accord avec l'existence de la spécificité de l'action mutagène du peroxyde succinique, et il est également compatible avec l'hypothèse d'un mécanisme d'action mutagène directe du peroxyde succinique ainsi que nous venons de l'exposer.

Ainsi, bien que l'on puisse imaginer certains types d'explications à cet effet de l'acide désoxycytidilique, on ne peut fournir à l'heure actuelle de schéma précis de son intervention lors de la genèse des mutations induites par le peroxyde succinique.

RESUME ET CONCLUSIONS

Nous avons entrepris un certain nombre d'expériences dans le but de déterminer si l'action mutagène du peroxyde succinique a lieu par un effet direct sur l'ADN intracellulaire ou par un effet indirect sur les précurseurs de l'ADN.

Pour mettre en évidence un éventuel effet indirect, nous avons tout d'abord étudié l'effet d'un remplissage du pool nucléotidique avant et après le traitement des bactéries par le peroxyde sur la fréquence des mutants Pro^+ induits.

De ces expériences, il ressort que :

1/ Une préincubation en présence d'acide désoxycytidilique augmente l'effet mutagène du peroxyde succinique.

2/ Une postincubation en présence des quatre désoxynucléosides (ou ribonucléotides) diminue l'action létale et mutagène du peroxyde succinique.

Ces résultats seraient compatibles avec l'hypothèse d'un mécanisme d'action mutagène indirecte du peroxyde succinique. Cependant, lorsque nous avons ensuite recherché l'action mutagène éventuelle des dérivés de peroxydation des précurseurs de l'ADN que nous avons isolé "in vitro", nous avons constaté qu'aucun des dérivés essayé n'a d'effet ni létal ni mutagène, pas plus que le traitement des bactéries par des solutions de nucléotides triphosphates peroxydés.

Nous en avons donc conclu que l'effet mutagène du peroxyde est vraisemblablement dû à une action directe de ce peroxyde sur l'ADN intracellulaire, et nous avons donc discuté l'effet des préincubations en présence d'acide désoxycytidylique dans cette alternative.

CHAPITRE VI

INFLUENCE DES CONDITIONS MÉTABOLIQUES SUR LA MUTAGÈNÈSE

L'induction des mutations chez les bactéries est un processus généralement complexe. Les conditions auxquelles sont soumises les bactéries après le traitement par un certain agent mutagène peuvent influencer profondément le déroulement des étapes successives qui aboutissent à l'établissement des mutations : c'est ainsi que KELNER (1949) a montré que l'on pouvait photoréactiver avec de la lumière visible, les bactéries irradiées par les rayons U. V. et par ce moyen diminuer l'effet létal et mutagène de ces radiations. D'autre part, WITKIN (1956) a attiré l'attention sur le rôle décisif de la synthèse protéique lors de l'induction de mutations réverses par les rayons U. V. chez E. Coli Wp Try^-. Elle a montré que le nombre des mutants induits détectés dépend de la richesse en amino-acides du milieu sur lequel on étale les bactéries irradiées : lorsqu'on ajoute au milieu synthétique un mélange des 20 amino-acides (ou une certaine quantité de bouillon nutritif), la fréquence des mutants induits est nettement supérieure à celle que l'on peut observer lorsque les mutants induits sont détectés par étalement des bactéries traitées sur milieu synthétique contenant seulement du tryptophane. L'apparition d'un grand nombre de mutants dans le milieu riche en aminoacides semble être en rapport avec le processus d'induction des mutations et non avec leur mode d'expression phénotypique puisque le milieu d'étalement des bactéries contient toujours le tryptophane nécessaire à l'expression phénotypique des mutants induits. Par ailleurs, tous les types de mutations ne se comportent pas de la même manière et certaines catégories de mutations peuvent s'établir même lorsque la synthèse protéique est bloquée après l'irradiation (mutation de résistance à la Sm, ou mutation d'indépendance vis-à-vis de la Sm (WITKIN et THEIL, 1960).

Selon WITKIN, cette différence de comportement serait due à des processus mutagéniques différents selon les mutations étudiées. Il n'est pas exclu cependant que ces différences de comportement soient dues à des caractéristiques phénotypiques particulières de chacun des sites de mutations. Dans cette alternative, les sites de mutations devraient manifester la même dépendance (ou indépendance) vis-à-vis de la synthèse protéique lorsqu'on induit les mutations quel que soit l'agent mutagène utilisé. Aussi nous a-t-il semblé interessant d'étudier et de comparer les effets, sur l'induction des mêmes mutations de conditions favorisant ou inhibant la synthèse protéique après le traitement des bactéries par le peroxyde succinique ou les rayons U. V.

En outre, les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet d'une postincubation en présence de désoxynucléotides (ou désoxynucléosides) (voir chap. précédent) sur la fréquence des mutations induites par le peroxyde succinique indiquaient la possibilité de modifier l'intensité de l'action mutagène de ce

peroxyde en faisant varier les conditions métaboliques auxquelles sont soumises les bactéries traitées. La détermination des événements métaboliques, qui favorisent ou empêchent l'établissement - au niveau génotypique - de différentes mutations induites par le peroxyde succinique nous semblait susceptible de permettre de préciser le mécanisme même de son action mutagène.

Nous avons ainsi été amenés à étudier l'effet, sur la fréquence des mutants induits Try^+ et Pro^+, de posttraitements qui favorisent ou inhibent la synthèse protéique.

Nous avons procédé de la façon suivante : les bactéries sont traitées par le peroxyde succinique ou les rayons U. V. dans les conditions habituelles, puis centrifugées et resuspendues dans un petit volume de milieu D. Des parties aliquotes de cette suspensions, sont alors diluées dans les milieux de composition suivante :

1/ Milieu 1 (HC) : milieu D + thymine (10^{-4} M), tryptophane (20 µg/ml), proline (20 µg/ml), glucose 1 % et hydrolysat de caséine (HC) à la concentration finale de 2 ‰.

2/ Milieu 2 (CM) : même milieu que le milieu 1 auquel on ajoute 40 µg/ml de chloramphénicol (CM).

3/ Milieu 3 : milieu 1 auquel on omet l'addition d'hydrolysat de caséine.

4/ Milieu 4 (DTG) : milieu D + thymine (10^{-4} M) + glucose 1 % sans les amino-acides essentiels.

Le milieu 1 est un milieu riche en amino-acides puisque l'hydrolysat de caséine contient tous les amino-acides à l'exception du tryptophane que l'on rajoute.

Le milieu 2 est un milieu dans lequel on provoque une inhibition de la synthèse protéique puisqu'il contient du CM.

Nous avons effectué la plupart des expériences en postincubant les bactéries traitées dans les milieux 1 et 2 respectivement. Le milieu 3 a été utilisé comme milieu de référence lors de l'étude des capacités biosynthétiques de bactéries traitées par le peroxyde succinique, le milieu 4 a été utilisé dans quelques expériences de postincubation de bactéries irradiées.

On incube des fractions aliquotes de bactéries traitées dans les milieux choisis pendant 60 min, puis on les centrifuge, on les resuspend dans un même volume de milieu D sans suppléments et on les étale sur les boîtes de milieu sélectif.

Il n'est pas nécessaire de laver les bactéries car les quantités d'amino-acides et de CM pouvant rester après centrifugation sont minimes en particulier par rapport à la quantité de milieu contenue dans les boites.

I - MUTATIONS REVERSES CONFERANT L'APTITUDE A LA BIOSYNTHESE DE LA PROLINE ($Pro^- \longrightarrow Pro^+$)

1 - Peroxyde succinique.

L'effet des postincubations sur l'action mutagène et létale du peroxyde succinique est nettement différent après postincubation dans les milieux 1 et

2 respectivement : la postincubation dans le milieu 1 a une action restauratrice sur la viabilité des bactéries traitées et provoque en même temps une diminution du nombre absolu et de la fréquence des mutants induits (tableau 1). Lorsque on postincube dans le milieu 2, on observe au contraire une légère diminution de la viabilité et une augmentation de la fréquence des mutants induits soit par rapport à celle que l'on observe parmi les bactéries qui n'ont pas subi de postincubation, soit par rapport à celle que l'on observe parmi les bactéries postincubées dans le milieu 1.

TABLEAU 1

Action du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-913}

Effets de différents posttraitements sur l'induction de la mutation Pro^+

Survie à t_o		Posttraitements		
		0	milieu 1	milieu 2
Exp. 1 9,6 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	24 ± 2,6	86 ± 9	34 ± 3
	Mut. induits/b.	17 ± 2,5	9,7 ± 1,5	12,8 ± 2,5
	Mut. ind. p. 10^8 S	710	112	380
Exp. 2 20,7 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	290 ± 25	549 ± 31	222 ± 25
	Mut. induits/b.	12,8 ± 5	3 ± 2	16 ± 3,5
	Mut. ind. p. 10^8 S	44	5,5	72
Exp. 3 3,4 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	32,3 ± 7,8	112 ± 7,1	7,7 ± 3,3
	Mut. induits/b.	7 ± 1	9,2 ± 1	6,6 ± 1,4
	Mut. ind. p. 10^8 S	218	82	850

1) Les bactéries sont traitées par le peroxyde succinique (10^{-4} g/ml) pendant 30 min puis centrifugées et remises en milieu D.
2) Des fractions aliquotes de cette suspension sont alors diluées dans les milieux 1 et 2, puis incubées pendant 60 min à 37° avec agitation. Elles sont ensuite centrifugées, remises en suspension dans du tampon phosphate et étalées sur la gélose de sélection et de numération à la dilution appropriée.
Milieu 1 : milieu HC
Milieu 2 : milieu HC + CM

2 - Irradiation U. V.

Nous avons réalisé des expériences analogues aux précédentes en postincubant les bactéries irradiées par les rayons U. V. dans les milieux 1, 2 et 4 (cf. pages précédente).

Les résultats que nous avons obtenus figurent sur le tableau 2.

TABLEAU 2

Action des rayons U. V. sur E. Coli 15 T^{-913}

Effets de différents posttraitements sur l'induction de la mutation Pro^+

Survie à t_o		Posttraitements			
		0	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 4
24,5 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	100 ± 8,1	78 ± 6,1	21 ± 3,9	-
	Mut. induits.b	16,2 ± 2,5	18,2 ± 2,7	16,9 ± 1,1	-
	Mut. ind. p. 10^8 S	157	230	800	
33 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	50 ± 3,3	50 ± 2	18 ± 6,4	-
	Mut. induits/b	63,5 ± 3,9	45,5 ± 2,9	11,8 ± 3,2	-
	Mut. ind. p. 10^8 S	1250	820	6500	-
26,4 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	100 ± 2,6	50 ± 4,2	(*)58 ± 2,7	(*)85 ± 2
	Mut. induits/b.	9,5 ± 2,5	23,3 ± 2,3	49,5 ± 3,8	6,0 ± 1,6
	Mut. ind. p. 10^8 S	95	470	850	70,5

1) Les bactéries suspendues en milieu minimum (sans facteurs de croissance ni glucose) sont irradiées avec une dose de 150 ergs/mm².
2) Des fractions aliquotes de la suspension irradiée sont ensuite diluées dans les milieux 1, 2 et 4 puis incubées pendant 60 min à 37° avec agitation. Elles sont ensuite centrifugées, remises en suspension dans du tampon phosphate et étalées sur la gélose de sélection et de numération à la dilution appropriée.
Milieu 1 : milieu HC
Milieu 2 : milieu HC + CM
Milieu 4 : milieu minimum sans amino-acides essentiels.

Ces résultats ne sont qu'en partie similaires à ceux observés lors de l'induction de mutations réverses Try^+ chez E. Coli W par WITKIN (1956), DOUDNEY et HAAS (1960), KADA, BRUN et MARCOVICH (1960). Ces différents auteurs ont observé que l'incubation des bactéries irradiées dans un milieu riche en amino-acides (HC) provoque une augmentation du nombre de mutants induits par les rayons U. V. ou les rayons X. (cf. expériences 1 et 3, tableau 2), alors qu'une postincubation soit en présence de CM, soit dans un milieu peu favorable à une synthèse protéique rapide a pour effet de diminuer le nombre des mutants induits. Dans le cas de l'induction de la mutation réverse $Pro^- \longrightarrow Pro^+$ étudiée ici, nous avons observé que si l'addition d'HC au milieu de postincubation provoque une légère augmentation du nombre absolu et de la fréquence des mutants induits, la postincubation en présence de CM (milieu 2) au lieu de diminuer la fréquence des mutants induits a pour effet de l'augmenter considérablement (tableau 2, colonne 2). Son effet est toujours plus intense que celui produit par la postincubation en présence d'HC. Le processus d'induction de la mutation Pro de 15 T^{-913} par les U. V. présente donc des caractéristiques qui diffèrent sensiblement de celles de l'induction de la mutation Try^+ de E. Coli Wp.

(*) Les bactéries ont été concentrées 5 fois par centrifugation avant d'être étalées.

La comparaison des résultats obtenus après action des rayons U. V. et après traitement par le peroxyde succinique permet donc de constater que l'effet de l'addition d'HC au milieu de postincubation sur la fréquence des mutations Pro^+ induites par ces deux agents est très différent : après action des U. V. ce type de posttraitement a plutôt tendance à augmenter l'effet mutagène, alors qu'après action du peroxyde succinique, il provoque une diminution du nombre des mutants induits. Au contraire, la postincubation en présence de CM a un effet analogue sur l'induction des mutations Pro^+ par ces deux agents et provoque dans les 2 cas une augmentation de la fréquence des mutants induits. L'incubation en présence de CM a en outre un effet létal particulièrement important sur les bactéries irradiées (cf. tableau 2 et 4). OKAGAKI (1959) a déjà signalé l'existence de ce phénomène qui semble être particulier aux souches de E. Coli 15, qu'elles soient ou non thymines déficientes(*).

L'incubation dans un milieu ne contenant pas les amino-acides essentiels (milieu 4) provoque également une augmentation de l'effet létal dans le cas des bactéries irradiées mais ne provoque pas d'augmentation de la fréquence des mutants induits (cf. tableau 2 exp. 3).

Ces résultats semblent indiquer que l'effet du CM pourrait être particulier au site de mutation étudié Pro^+ puisqu'il est identique pour les deux mutagènes, alors que l'effet de la postincubation en présence d'HC diffère suivant l'agent mutagène utilisé.

II - MUTATIONS REVERSES CONFERANT L'APTITUDE A SYNTHETISER DU TRYPTOPHANE ($Tr^- \longrightarrow Try^+$)

1 - Peroxyde succinique.

Ces expériences ont été d'une interprétation assez malaisée étant donné la faible intensité avec laquelle le peroxyde succinique induit cette mutation réverse. Toutefois, nous avons observé des effets qui semblent analogues à ceux décrits dans le cas de l'induction des mutations réverses Pro^+ : la présence d'HC dans le milieu de postincubation diminue et le nombre et la fréquence des mutants induits, alors que celle de chloramphénicol provoque une augmentation de la fréquence des mutants induits (tableau 3).

2 - Irradiation U. V.

L'étude des effets des différents milieux de postincubations que nous avons utilisés (1, 2 et 4) sur l'induction de cette mutation par les U. V. a montré que ces effets étaient analogues à ceux observés par WITKIN lors de l'induction de la mutation réverse Try^+ de la souche de E. Coli Wp : l'incubation des bactéries irradiées en présence d'HC provoque une augmentation de fréquence des mutants induits alors que l'incubation en présence de CM provoque une diminution importante et du nombre et de la fréquence des mutants induits (tableau 4).

(*) Nous avons vérifié que les mutants Pro^+ réverses étaient également sensibles à l'action létale du CM après l'irradiation : l'augmentation de la fréquence des mutants induits Pro^+ après incubation en présence de CM ne provient donc pas d'une sélection.

TABLEAU 3

Action du peroxyde succinique sur E. Coli 15 T^{-913}

Effet de différents posttraitements sur l'induction de la mutation Tr^+

Survie à t_o		Posttraitements		
		0	Milieu 1	Milieu 2
17 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	71 ± 7	63 ± 2,5	2,4 ± 0,8
	Mut. induits/b.	2,9 ± 0,6	0,5 ± 0,3	1,2 ± 0,2
	Valeur de t	4,7	0,5	3,8
	Prob. de cette valeur de t	0,1 %	60 %	0,1 %
	Mut. ind. p. 10^8 S	47	(15)	710
31 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	2,5 ± 0,3	31 ± 0,5	7 ± 0,7
	Mut. induits/b.	0,8 ± 0,7	1,1 ± 1,3	2,1 ± 0,6
	Valeur de t	0,73	0,81	2,48
	Prob. de cette valeur de t	50 %	40 %	1 %
	Mut. ind. p. 10^8 S	(280)	(35)	150
30 %	Bact/b/ ($\times 10^5$)	98 ± 1,7	127 ± 11	143 ± 0,7
	Mut. induits/b.	1,5 ± 0,3	0,8 ± 0,6	2,7 ± 0,7
	Valeur de t	2,32	0,79	2,4
	Prob. de cette valeur de t	5 %	45 %	2 %
	Mut. ind. p. 10^8 S	31	(63)	110

1) et 2) comme dans le tableau 1. 3) étalement des bactéries traitées en présence de 0,1 mg/ml de tryptophane.

3) Comme le nombre de mutants induits est très faible, on a donc comparé, dans chaque expérience, à l'aide d'un test t, les moyennes des nombres de mutants observés dans les échantillons de bactéries traitées avec la moyenne du nombre de mutants observés dans l'échantillon de bactéries témoins. On a indiqué cette valeur de t et sur la ligne inférieure on a indiqué la probabilité d'obtenir cette valeur de t dans le cas de l'"hypothèse nulle", c'est-à-dire lorsque on suppose qu'il n'y a pas de mutants induits. Lorsque la probabilité d'obtenir la valeur de t trouvée dans l'expérience est inférieure à 5 %, on considère que l'"hypothèse nulle" n'est pas valable et qu'il y a effectivement des mutants induits.

TABLEAU 4

Action des rayons U. V. sur E. Coli 15 T^{-913}

Effets de différents posttraitements sur l'induction de la mutation Try^+

Survie à t_o		0	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 4
17 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	57 ± 9	72 ± 14	29 ± 7,8	13,2 ± 1,5
	Mut. induits/b.	70 ± 1,2	115 ± 7	16,5 ± 1,8	3,2 ± 0,7
	Mut. ind. p. 10^8 S	1230	1540	460	242
22 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	56,9 ± 3,6	7,6 ± 4,3	1,6 ± 0,6	7,4 ± 1,7
	Mut. induits/b.	38,4 ± 3,1	13 ± 1,9	0	0
	Mut. ind. p. 10^8 S	675	1700	0	0
35 %	Bact/b. ($\times 10^5$)	140 ± 8,5	21,9 ± 2	3,6 ± 0,6	2,5 ± 0,5
	Mut. induits/b.	41 ± 3,1	16,4 ± 2,4	0	0
	Mut. ind. p. 10^8 S	292	750	0	0

Même légende que pour le tableau 3.

DISCUSSION

Nous avons étudié l'effet de différents posttraitements auxquels nous avons soumis les bactéries traitées par le peroxyde succinique ou les rayons U. V. sur la fréquence de l'induction de deux mutations réverses situées sur le même génome.

Cette étude a permis de montrer que les posttraitements ont une influence très marquée sur le nombre de mutants induits détectables. Des posttraitements similaires ont des effets qui diffèrent notablement d'une part, selon les agents mutagènes utilisés et d'autre part, pour un même agent mutagène (en l'occurence les rayons U. V.) selon les sites de mutations étudiés.

1 - Mutation Try^+

Après l'irradiation ultraviolette la fréquence de l'induction de la mutation réverse Try^+ est augmentée par une incubation dans un milieu favorable à la synthèse protéique, elle est diminuée au contraire, par une incubation dans un milieu qui inhibe la synthèse protéique.

Après action du peroxyde succinique une postincubation dans un milieu favorable à la synthèse protéique tend à diminuer la fréquence des mutants induits détectés, alors qu'une postincubation en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique (CM) tend à augmenter cette fréquence.

Ces résultats indiquent que l'effet des postincubations ne peut être attribué à un effet sur l'expression phénotypique de cette mutation : ils sont donc attribuables à un effet des postincubations sur les processus même de l'induction de cette mutation par ces agents mutagènes.

2 - Mutation Pro^+

La fréquence de l'induction des mutations réverses Pro^+, après action des rayons U. V., tend à être augmentée par une postincubation dans un milieu favorable à la synthèse protéique, elle l'est plus encore par une incubation dans un milieu qui inhibe la synthèse protéique. Après l'action du peroxyde succinique une postincubation dans un milieu favorable à la synthèse protéique diminue la fréquence avec laquelle cette mutation est induite (contrairement à ce qui a lieu après action des U. V. pour cette même mutation), alors qu'une postincubation dans un milieu qui inhibe la synthèse protéique provoque une augmentation de la fréquence des mutants Pro^+ induits.

Etant donné la similarité des effets d'une postincubation en présence de CM sur l'induction de la mutation Pro^+ par les rayons U. V. et le peroxyde succinique on aurait pu penser que cet effet était particulier à cette mutation et lié à la sensibilité à la pression de population que manifestent les mutants Pro^+, puisque l'incubation en présence de CM provoque une diminution du nombre de bactéries viables. Néanmoins, une postincubation dans le milieu 4 de bactéries irradiées (sans amino-acides essentiels), qui provoque également une diminution de la viabilité des bactéries ne provoque pas d'augmentation de la fréquence des mutants Pro^+ induits : le rôle de la densité de population peut donc être considéré comme négligeable dans ces expériences(*). Et on peut conclure que, dans ces conditions l'effet des postin-

---

(*) Nous pensons toutefois que c'est cet effet de densité de population qui est responsable de la diminution du nombre de mutants Pro^+ induits par les rayons UV ou le px. succinique lorsqu'on étale les bactéries traitées sur des boites de milieu gélosé contenant du bouillon nutritif ou de la proline (1ère partie, chap. IV).

cubations sur la fréquence des mutants induits n'est pas dû à une action au niveau de l'expression phénotypique, mais bien à une action sur le processus de l'induction des mutations Pro^+.

Il convient donc de discuter les résultats que nous avons obtenus dans cette optique.

Nous discuterons tout d'abord les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet de différents posttraitements sur les mutations induites par irradiation ultra-violette.

Pour cet agent, nous avons obtenu des réponses très différentes vis-à-vis des posttraitements, suivant les sites de mutations étudiés : la fréquence des mutations réverses Try^+ augmente lorsqu'on enrichit en amino-acides le milieu de postincubation et elle diminue lorsqu'on postincube les bactéries irradiées en présence de CM, alors que la fréquence des mutations réverses Pro^+ induites par ce même agent présente la particularité paradoxale d'être augmentée et par une postincubation en présence de CM et par une postincubation en présence d'hydrolysat de caséine.

WITKIN et THEIL (1960) avait déjà décrit deux classes de mutations induites par irradiation U. V. se distinguant par leur réaction vis-à-vis des posttraitements :

1/ Mutations dont la fréquence d'induction dépend de la richesse en amino-acides du milieu de postincubation (fréquence augmentée par un milieu riche en amino-acides, diminuée par un milieu contenant du CM) (les mutations Try^+ de Coli 15 T^{-913} appartiennent à cette classe).

2/ Mutations dont la fréquence d'induction n'est pas modifiée par la présence de CM dans le milieu de postincubation.

Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'il existerait une troisième classe de mutations dont la fréquence d'induction serait augmentée par une postincubation en présence d'amino-acides et plus encore par une postincubation en présence de CM.

L'existence des deux premiers types de réactivité vis-à-vis des posttraitements a amené WITKIN et THEIL (1960) à supposer que l'induction des mutations peut s'effectuer suivant au moins deux mécanismes. Suivant cette hypothèse, les résultats que nous avons obtenus avec la mutation Pro^+ indiqueraient l'existence d'un troisième mécanisme d'induction des mutations par les rayons U. V.

En effet, puisque la postincubation en présence d'HC a tendance à augmenter la fréquence des mutants Pro^+ induits par les U. V., aussi bien que la postincubation en présence de CM, on peut penser, soit qu'une même mutation peut être induite par deux processus distincts, soit qu'un mécanisme unique est à l'origine des deux effets observés.

Dans la première hypothèse, l'augmentation de la fréquence des mutants Pro^+ induits par les U. V. après une postincubation en présence d'HC relèverait d'un des processus décrit par WITKIN tandis que l'augmentation de fréquence de ces mêmes mutations après postincubation en présence de CM dépendrait d'un processus d'ordre différent, ce qui conduirait à distinguer éventuellement deux classes de mutants Pro^+ induits par U. V.

Les effets de postincubations sont très différents lorsque les bactéries ont été traitées par le peroxyde succinique.

Après action du peroxyde succinique, l'incubation en présence d'HC provoquer une restauration(*) des bactéries traitées, alors que l'incubation en présence de CM provoque une légère diminution de la viabilité des bactéries traitées et une augmentation de la fréquence des mutants induits pour les deux mutations étudiées.

L'existence d'un effet de restauration dans le milieu 1, riche en amino-acides pouvait faire penser à l'existence de modifications de la paroi cellulaire de bactéries traitées par le peroxyde, modifications qui auraient pour conséquence un changement de la perméabilité des bactéries. Ceci pourrait permettre une diffusion dans le milieu environnant soit du peroxyde absorbé par les bactéries, soit de produits toxiques dérivés du peroxyde : cette diffusion, plus efficace en milieu liquide qu'en milieu solide, permettrait une restauration des bactéries incubées en milieu liquide par rapport à celles qui sont immédiatement étalées sur milieu solide. Cet effet restaurateur du milieu 1 ne peut toutefois s'expliquer par l'existence d'une diffusion extracellulaire de produits toxiques puisqu'il n'y a pas de restauration dans le milieu 2, or, on sait que le chloramphénicol n'affecte pas la perméabilité cellulaire (T. BROCK, 1961) : la diffusion de produits toxiques, si elle a lieu serait donc similaire dans le milieu 1 et dans le milieu 2 qui sont de composition identique au chloramphénicol près.

Cet effet restaurateur ne peut s'expliquer non plus par la seule présence des amino-acides libres dans le milieu puisque ceux-ci sont également présents dans le milieu 2 : il semble donc bien que les amino-acides de l'hydrolysat de caséine interviennent dans un processus métabolique qui favorise la restauration des bactéries et la perte de mutants potentiels.

Etant donné que la postincubation en présence de CM augmente la fréquence des mutations induites pour les deux mutations étudiées, il semble que le processus d'induction des mutations par le peroxyde succinique ne requiert pas de synthèse protéique précoce. Ce processus se distingue donc du processus d'action mutagène des U. V. observés par WITKIN et par nous-mêmes dans le cas de l'induction de mutations réverses Try^+, mais il présente une certaine analogie avec le troisième processus d'action mutagène des U. V. que nous avons décrit ainsi qu'avec le processus d'induction de mutations réverses de certains agents alkylants tels que le diéthylsulfate (STRAUSS et OKUBO, 1960), puisqu'une incubation en présence de CM provoque également une augmentation des mutations réverses Try^+ induites par cet agent.

RESUME ET CONCLUSION

Nous avons étudié l'effet de différents posttraitements auxquels on soumet les bactéries traitées soit par le peroxyde succinique, soit par les rayons U. V. sur le fréquence de l'induction de deux mutations réverses par ces deux agents mutagènes (peroxyde succinique, U. V.)

(*) Restauration : augmentation du nombre de bactéries viables accompagnée d'une diminution de fréquence des mutants induits.

Cette étude a permis de montrer que les conditions métaboliques auxquelles on soumet les bactéries interviennent dans le processus de la mutagénèse induite tant par les rayons U. V. que par le peroxyde succinique. Néanmoins, les modalités de cette intervention diffèrent pour un même site selon le mutagène employé.

1/ Nous avons pu observer l'existence d'une différence de réponse mutagène à différents posttraitements des deux sites de mutations que nous avons étudiés vis-à-vis de l'effet mutagène des U. V. En plus des deux classes de mutations précédemment décrites par WITKIN, que l'on distingue par leur réponse à différents posttraitements (1/ mutations dont la fréquence d'induction est augmentée par une postincubation en présence d'amino-acides et diminuée par une postincubation en présence de chloramphénicol. 2/ mutations dont la fréquence d'induction n'est pas modifiée par la présence de chloramphénicol dans le milieu de postincubation) nous avons mis en évidence l'existence d'une troisième classe de mutations dont la fréquence d'induction augmente aussi bien après une postincubation en présence de chloramphénicol qu'après une postincubation en présence d'hydrolysat de caséine.

2/ Nous avons observé par contre qu'après action du peroxyde succinique, la réponse mutagène des deux sites de mutation étudiés est la même. Elle diffère de celle que l'on obtient après action du rayonnement U. V. et semble être caractéristique du mode d'action de cet agent ; une postincubation en présence d'hydrolysat de caséine provoque une diminution de la fréquence des mutants induits alors qu'une postincubation en présence de chloramphénicol provoque une augmentation de la fréquence des mutants induits, et une légère diminution du nombre de bactéries viables.

3/ L'ensemble de ces résultats indique a) que dans nos conditions d'expériences les différences de comportement des différents sites de mutations suivant les conditions métaboliques qui, suivant l'irradiation U. V. ou le traitement par le peroxyde succinique ne sont pas dues à des caractéristiques particulières de chacun de ces sites de mutations, mais reflètent des processus d'établissement des mutations de nature différentes ; b) que l'établissement des mutations induites par le peroxyde succinique ne requiert pas de synthèse protéique précoce, au contraire les conditions favorables à la synthèse protéique provoquent la restauration des bactéries et la perte des mutants potentiels, alors que les conditions qui apparemment inhibent la synthèse protéique (postincubation en présence de CM) favorisent l'établissement définitif des mutants potentiels.

CHAPITRE VII

ANALYSE DES CAPACITÉS BIOSYNTHÉTIQUES DES BACTÉRIES TRAITÉES PAR LE PEROXYDE SUCCINIQUE

Puisque la composition du milieu dans lequel on incube les bactéries traitées par le peroxyde succinique a une influence sur la fréquence avec laquelle cet agent induit les mutations, il semblait particulièrement intéressant d'examiner les capacités biosynthétiques de bactéries traitées par le peroxyde succinique, puis incubées dans les différents milieux dont nous avons étudié les effets sur la fréquence des mutations induites. L'existence de différences dans les capacités biosynthétiques des bactéries incubées dans ces différentes conditions pourrait être révélatrice des mécanismes opérant soit la restauration des lésions mutagènes, soit la transformation de lésions mutagènes potentielles en lésions mutagènes définitives.

Aussi avons-nous analysé les variations de la teneur en ADN, ARN, N protéique, ainsi que la teneur en composés nucléotidiques du pool acido-soluble de bactéries traitées par le peroxyde succinique, centrifugées, remises en suspension dans des milieux de composition différente puis incubées à 37°. Au cours de l'incubation, nous avons fait des prélèvements successifs de parties aliquotes des suspensions bactériennes sur lesquels nous avons déterminé les teneurs respectives d'ADN, ARN, N protéique et de composés nucléotidiques acido-solubles. Les techniques que nous avons utilisées pour pratiquer ces différentes analyses ont été décrites au chapitre I (Matériel et Méthodes).

I - COMPORTEMENT DES BACTERIES TRAITEES PAR LE PEROXYDE SUCCINIQUE PUIS RESUSPENDUES EN MILIEU MINIMUM

Nous décrirons tout d'abord les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude des capacités biosynthétiques de bactéries traitées par le peroxyde succinique puis postincubées en milieu D additionné de thymine, tryptophane, proline et glucose à la concentration usuelle (milieu 3).

1 - ADN

Les cultures de bactéries traitées par le peroxyde contiennent un mélange de bactéries viables et de bactéries "non viables", c'est-à-dire incapables de donner naissance à un clône. Lorsqu'on détermine s'il y a ou non un arrêt de synthèse de l'ADN, il faut tenir compte de ce fait. D'une part on peut supposer que les bactéries non viables sont encore capables de certaines synthèses bien qu'incapables de se multiplier (ce qui est le cas lors

de mortalité provoquée par la carence en thymine de souches thymine déficientes après que l'on ait rajouté de la thymine). D'autre part, on peut supposer que les bactéries non viables ne sont plus capables d'aucunes synthèses (phénomène de tout ou rien), mais comme elles constituent la plus grande partie de la population des bactéries traitées, il faut tenir compte de leur présence lorsqu'on analyse les résultats des dosages pratiqués sur les échantillons de bactéries après la peroxydation.

Dans la première hypothèse, on doit s'attendre à observer un taux d'accroissement appréciable de l'ADN des cultures au début de l'incubation, ensuite, ce taux d'accroissement devrait passer par une valeur minimale avant de croître à nouveau jusqu'à la valeur caractéristique du milieu de culture employé. Nous n'avons pas observé de résultats de ce type (tableau 1).

TABLEAU 1

Etude des variations de la teneur en ADN d'échantillons de bactéries traitées par le peroxyde succinique. Concentration de peroxyde : 10^{-4} g/ml, durée du traitement 30 min.

Exp. N°	Survie	Temps de postincubation	µg d'ADN dosé pour 10 ml de culture		µg d'ADN attendu en 2	différence entre 2 et 3
			témoins 1	traitées 2		
I	3,6 %	0	114	132	132	0
		65 min	177	134	134	0
		130	269	146	140	- 6
		240	-	123	153	- 30
		270	-	153	160	- 7
II	21 %	0	71,5	62,5	62,5	0
		35 min	79,5	75,5	63,5	+11,7
		75	152,5	74,0	77,8	- 13,8
		100	177,5	73,0	81,2	- 8,2
		125	211,5	76,5	88,6	- 12,1
III	30 %	0	52,2	40	40	0
		30	-	55,6	48,0	+ 7,6
		60	71,0	55,6	43,6	+ 12
		90	88,0	62,5	48,8	+ 13,7
		120		78,8	52,0	+ 20,8
IV	17 %	0	86	84	84	0
		45 min	130	86	91	- 4
		80	148	70	94	- 24
		125	169	48	98	- 58
		165	232	58	110	- 42
		200	-	68		
		260	-	107		
		315	-	155		
		475	-	244		

Dans la deuxième hypothèse on peut calculer les quantités d'ADN, qu'auraient synthétisé les seules bactéries survivantes, en supposant qu'elles aient les mêmes capacités biosynthétiques que les bactéries témoins que l'on étudie conjointement. C'est ce que nous avons fait (tableau 1) et nous avons trouvé dans trois expériences sur quatre un accord assez bon entre la quantité d'ADN attendue sur la base de cette hypothèse. Dans la quatrième expérience, on observe au début de l'incubation une diminution de la teneur en ADN des prélèvements. Cette diminution était d'ailleurs accompagnée d'une lyse assez importante des bactéries traitées, lyse que l'on n'observe pas généralement. Etant donné l'accord relativement bon entre les quantités d'ADN prévues dans les échantillons et les quantités d'ADN effectivement dosées dans les trois premières expériences, nous pensons pouvoir conclure que la synthèse de l'ADN est assez peu perturbée chez les bactéries qui survivent au traitement par le peroxyde succinique.

2 - ARN

Si l'aptitude à la biosynthèse de l'ADN semble assez peu perturbée chez les bactéries survivant au traitement par le peroxyde, l'aptitude à la biosynthèse de l'ARN semble beaucoup plus affectée. Dans trois expériences on observe une diminution de la quantité de l'ARN intracellulaire ou du moins un retard marqué pour la reprise de la synthèse de l'ARN : l'accroissement de la teneur en ARN des échantillons de bactéries peroxydées ne commence donc qu'après l'accroissement de la teneur en ADN des mêmes échantillons. (tableau 2).

TABLEAU 2

Etude des variations de la teneur en ARN d'échantillons de bactéries traitées par le peroxyde succinique.

Concentration du peroxyde 10^{-4} g/ml, durée du traitement 30 min.

Survie à t_o	Durée de postincubation	µg de P de l'ARN dosés pour 100 ml de culture		µg de P attendus en 2	Différence entre 2 et 3
		témoins 1	traitées 2	3	
30 %	0 min	242	300	242	+ 58
	30	332	190	270	- 80
	60	625	205	366	- 161
	90	-	244	-	-
	120	-	284	-	-
21 %	0	205	208	208	- 0
	35	430	230	255	- 25
	75	511	238	272	- 34
17 %	dosage de l'ADN par UV				
	0	228	247	247	0
	80	810	98	207	- 109
	165	1280	61	211	- 140
	260	-	143	211	- 68

3 - Protéines

L'étude de la synthèse protéique globale des bactéries traitées (effectuées par dosage d'azote sur le résidu d'extraction perchlorique) montre que la synthèse protéique est inhibée chez les bactéries survivantes à la peroxydation. (tableau 3).

TABLEAU 3

Etude des variations de la teneur en N protéique d'échantillons de bactéries traitées par le peroxyde succinique. Concentration du peroxyde 10^{-4} g/ml, durée de traitement 30 min.

Survie à t	Durée de postincubation	µg de N protéique dosés pour 100 ml de culture		µg de N attendu 3	Différence entre 2 et 3
		Témoin 1	Traité 2		
21 %	0 min	167	168	168	0
	35	168	168	168	0
	75	404	168	217	- 49
	100	496	-	-	-
30 %	0	124	124	124	0
	30	133	129	127	+ 2
	60	200	113	137	- 24

4 - Pool nucléotidique.

Nous avons vu que la teneur en composés nucléotidiques du pool acido-soluble intracellulaire n'était pas modifiée par la peroxydation. L'étude des variations quantitatives de ce pool après la peroxydation montre que la teneur en composés nucléotidiques varie peu après la peroxydation : on n'observe pas l'augmentation à laquelle on pourrait s'attendre si les nucléotides résultants de la dégradation de l'ARN le reconstituait (tableau 4).

TABLEAU 4

Etude des variations de la teneur en composés nucléotidiques du pool acido-soluble de bactéries traitées par le peroxyde succinique. Concentration du peroxyde 10^{-4} g/ml, durée du traitement 30 min.

Survie à t	Durée de postincubation	Absorption à 260 mµ de l'extrait acido-soluble de 10 ml de culture		Absorption attendue en 2 3	Différence entre 2 et 3
		Témoin 1	Traité 2		
21 %	0 min	31	23	23	0
	35	42	23	25	- 2
	75	37	23	23	0
	100	387	-	-	-
30 %	0	16	10	10	- 2
	30	13	7	9	+ 2
	60	18,9	12	10	- 2
	90	-	9	-	-
17 %	0	16	17	17	0
	45	19	10	17,5	- 5,5
	80	51	8	23,5	- 16,5
	125	30	10	19,7	- 9,7
	165	22	10	18	- 8,3
	200	-	16	-	-

II - COMPORTEMENT DES BACTERIES TRAITEES PAR LE PEROXYDE SUCCINIQUE MAIS RESUSPENDUES EN PRESENCE D'HYDROLYSAT DE CASEINE (HC) OU DE CHLORAMPHENICOL (CM) ET D'HYDROLYSAT DE CASEINE

Nous avons étudié les effets de l'incubation en présence soit d'hydrolysat de caséine (milieu 1), soit de chloramphénicol(*) et d'hydrolysat de caséine (milieu 2) sur la reprise des divers processus biosynthétiques de bactéries traitées par le peroxyde. Nous avons comparé les résultats obtenus dans ces conditions, à ceux que l'on observe lorsque les bactéries sont incubées en milieu minimum (milieu 3) puisque ce milieu est celui dont la composition se rapproche le plus du milieu gélosé sur lequel on étale les bactéries traitées pour sélectionner les mutants induits.

1 - Effet de l'addition d'HC au milieu de postincubation.

Nous avons vu au chapitre précédent qu'une postincubation d'une heure dans le milieu 1 provoque une restauration des bactéries traitées. Si on compare la façon dont s'effectuent les biosynthèses dans ce milieu avec ce qui se passe en milieu minimum (milieu 3), on observe une reprise plus précoce et à taux supérieur à celui du milieu 3, de l'accroissement des divers constituants cellulaires que nous avons étudiés (ADN, ARN, N protéique et composés nucléotidiques du pool acido-soluble) : fig. VII-1 et fig. VII-2. Lorsque la peroxydation a été assez douce comme dans l'expérience rapportée fig. VII-1 (68 % de survivants), l'accroissement de l'ADN et des composés nucléotidiques du pool acido-soluble est immédiat dans le milieu 1. Dans l'expérience rapportée sur la figure VII-2, on observe dans tous les milieux de postincubation une dégradation assez importante des divers constituants cellulaires, accompagnée d'une lyse partielle des bactéries. Ce phénomène est inhabituel, néanmoins nous avons donné les résultats de cette expérience car c'est la plus complète que nous ayons réalisée. On peut voir sur la figure IV-2 qu'en présence d'HC les phénomènes de dégradation sont moins importants et que l'accroissement des divers constituants cellulaires que nous avons étudié, a lieu à un taux supérieur à celui que l'on observe lorsque les bactéries sont incubées dans le milieu 3. Les composés nucléotidiques du pool acido-soluble sont les composants cellulaires dont l'accroissement est le plus précoce. Il semble que l'effet le plus caractéristique de l'incubation en présence d'HC soit de permettre un accroissement rapide de ces composés.

2 - Effet de l'addition de CM et d'HC au milieu de postincubation.

Une postincubation de 60 min dans un milieu contenant 40 µg/ml de chloramphénicol et de l'hydrolysat de caséine (milieu 2) a pour effet de provoquer une légère diminution de la viabilité des bactéries traitées par le peroxyde et surtout une augmentation de la fréquence des mutants induits.

Pour étudier l'effet de ce milieu sur la reprise des divers processus biosynthétiques des bactéries peroxydées, nous avons incubés les bactéries traitées pendant 80 min dans le milieu 2, puis nous les avons centrifugées pour éliminer le chloramphénicol ; nous les avons ensuite resuspendues en milieu 3 et continué l'incubation pendant 7 heures. Les résultats que nous avons obtenus sont représentés sur la figure VII-2 : le signe ⌣ indique la durée du traitement en présence de CM. On voit sur cette figure, 1) que la dégradation de l'ADN n'est pas plus poussée que lorsque l'incubation a lieu

---

(*) Pour la composition exacte des milieux, voir p. 80.

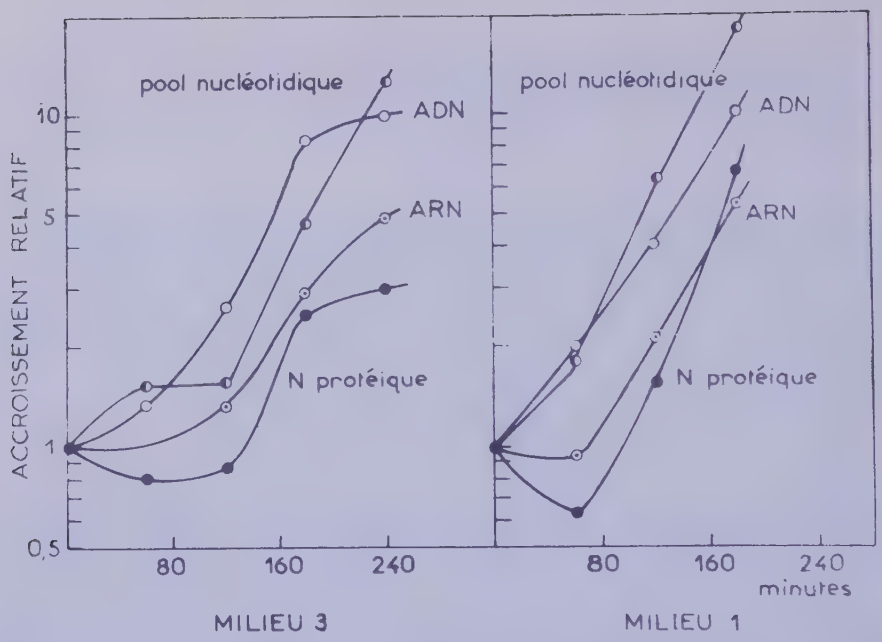


Fig. VII-1 - Etude de la reprise des différentes synthèses chez les bactéries traitées par le peroxyde succinique puis resuspendues. 1/ en milieu minimum contenant les suppléments essentiels (milieu 3) et 2/ en milieu riche en amino-acides (milieu 1). La survie après le traitement par le peroxyde était de 68 %.

immédiatement en milieu 3. La biosynthèse de l'ADN reprend bien avant celle des autres constituants cellulaires et plus tôt que dans les autres conditions de postincubation, mais elle a lieu à un taux très faible, bien inférieur à ceux que l'on observe et dans le milieu 1 et dans le milieu 3. 2) la dégradation de l'ARN intracellulaire est beaucoup plus poussée que lorsque les bactéries sont immédiatement en milieu 3, mais pas celle des protéines. La reprise de l'accroissement de l'ARN a lieu à peu près au même moment et à un taux comparable à celui des bactéries incubées immédiatement en milieu 3. La reprise de l'accroissement des protéines a lieu également à peu près au même moment que lorsque les bactéries sont incubées immédiatement en milieu 3, mais à un taux qui est d'abord inférieur à celui du milieu 3. Ce taux augmente ensuite et devient alors supérieur à celui du milieu 3. 3) l'accroissement de la teneur du pool acido-soluble en composés nucléotidiques reprend en même temps que celui de l'ARN et des protéines mais cet accroissement a lieu tout d'abord à un taux excessivement lent. Ce taux s'élève ensuite et ceci au moment ou celui de la synthèse protéique s'accélère également.

En conclusion, disons que la reprise précoce, mais à un taux excessivement lent de la synthèse de l'ADN, nous semble être l'effet le plus caractéristique de l'incubation en présence de chloramphénicol.

DISCUSSION

Ces expériences, entreprises dans le but d'essayer de préciser le mécanisme de l'action mutagène du peroxyde succinique, nous ont montré que celui-ci, à l'encontre des rayons U. V. ou des moutardes azotées ne provoque pas d'arrêt specifique de synthèse de l'ADN (KELNER, 1953, KANAZIR et ERRERA, 1954. HAROLD et ZIPORIN, 1958, 1959). La biosynthèse de

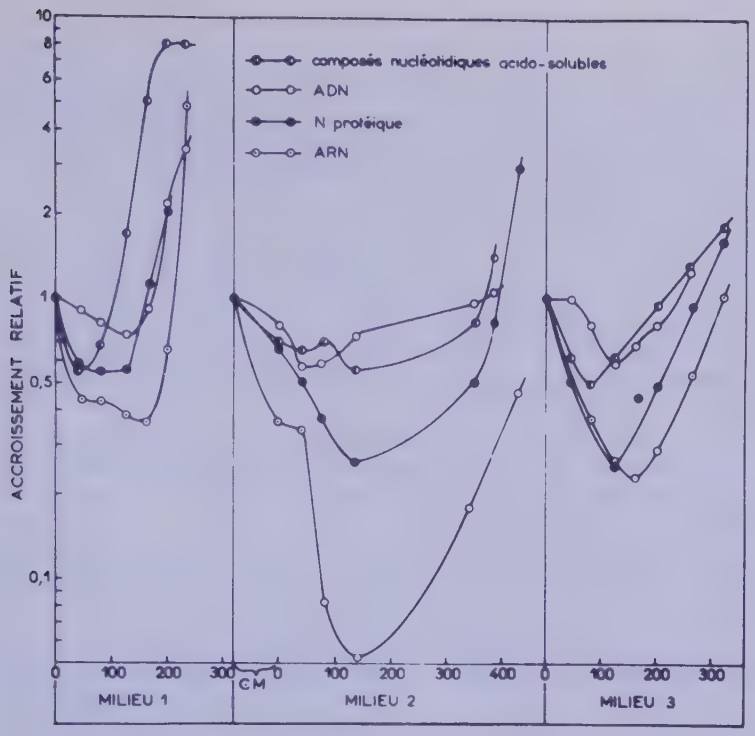


Fig. VII-2 - Etude de la reprise des différentes biosynthèse après traitement des bactéries par le peroxyde succinique. 1/ Les bactéries traitées sont resuspendues dans le milieu 1 riche en amino-acides (composition du milieu p. 166). 2/ Les bactéries traitées sont resuspendues en présence CM (milieu 2) pendant 80 min., puis centrifugées et resuspendues dans le milieu 3. 3/ Les bactéries traitées sont immédiatement resuspendues dans le milieu 3. La survie dans cette expérience était de 17 %.

l'ADN chez les bactéries survivantes semble être au contraire moins affectée par le traitement par le peroxyde succinique que la biosynthèse de l'ARN et des protéines.

Pourtant nous savons que in vitro et in vivo le peroxyde est susceptible d'agir chimiquement sur l'ADN. Mais le taux d'inactivation du principe transformant de pneumocoque par le peroxyde succinique dépend du degré de pureté des solutions d'ADN, (LATARJET, et REBEYROTTE, 1958), ce qui montre que le peroxyde réagit sur d'autres substances et que l'on peut, même en solution, protéger l'ADN. Il n'est donc pas étonnant que "in vivo" le peroxyde succinique agisse sur les différents constituants cellulaires qu'il rencontre lors de la pénétration dans les bactéries. L'intensité de son pouvoir mutagène est assez faible en regard de son effet létal : ceci s'explique précisément par le fait que l'ADN n'est que l'un des substances attaquée par le peroxyde succinique et que l'action létale que l'on observe est vraisemblablement due à l'ensemble des perturbations qu'il provoque dans la cellule plutôt qu'à son action sur un constituant cellulaire particulier.

Nous avons vu que l'incubation en présence d'hydrolysat de caséine, se traduit par :

1/ Une augmentation précoce des composés nucléotidiques du pool acido-soluble et :

2/ Une reprise plus rapide et à des taux plus élevés que dans le milieu 3, de la biosynthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines. Il semble donc que la présence des amino-acides dans le milieu exerce un effet restaurateur parce qu'elle permet un accroissement rapide du contenu du pool nucléotidique des bactéries, ce qui favorise sans doute la reprise relativement rapide de la synthèse de l'ADN et de l'ARN que l'on observe.

Mais l'incubation en présence d'hydrolysat de caséine n'a pas seulement un effet restaurateur sur la viabilité des bactéries traitées, elle provoque également une diminution du nombre des mutants induits observés. *La reprise rapide des synthèses cellulaires favorise donc, soit un processus de réparation des lésions mutagènes, soit un processus qui empêche la transformation de lésions mutagènes potentielles en lésions mutagènes efficaces.*

L'incubation en présence de chloramphénicol, qui provoque une augmentation de la fréquence des mutants induits, a pour effet de ralentir considérablement toutes les synthèses cellulaires particulièrement celle de l'ADN, et ceci pendant un temps assez long.

Ainsi, il semble que le ralentissement prononcé de la synthèse de l'ADN, ou l'absence de synthèse protéique concomitante à cette biosynthèse ralentie, soit favorable à l'établissement des mutations.

L'examen des répercussions d'une synthèse plus ou moins rapide de l'ADN sur l'évolution des lésions "potentiellement" mutagènes provoquées par l'action du peroxyde succinique devrait nous permettre de préciser quel est le type de lésions qu'il produit (lésion mutagène réversible ou lésion prémutagène).

a) Lésion mutagène réversible.

Si la lésion initiale est une lésion mutagène d'emblée, mais spontanément réversible, une synthèse rapide d'ADN devrait permettre de "fixer" la lésion sous forme d'une nouvelle paire de bases, à moins que les conditions métaboliques favorables à une synthèse rapide de l'ADN, ne soient aussi favorables à l'établissement d'un processus plus rapide de réversion des lésions mutagènes que le processus spontané de réversion de ces lésions. Dans cette alternative, l'effet de "fixation" de ces lésions dû à la synthèse rapide de l'ADN est contrebalancé par le processus de réversion rapide. L'incubation dans le milieu 1, qui stimule la synthèse de l'ADN, peut donc provoquer, soit une augmentation de la fréquence des mutants induits (si le processus de "fixation" prédomine), soit une diminution de la fréquence des mutants induits (si le processus de réversion prédomine), soit avoir un effet négligeable (si les deux processus s'équilibrent).

Au contraire, l'incubation dans le milieu 2 qui ralentit la biosynthèse de l'ADN (sans stimuler les autres biosynthèses) favorisant la réversion des lésions mutagènes *avant* la réplication de cet ADN devrait provoquer une diminution de la fréquence des mutants induits.

Si le peroxyde produisait des lésions mutagènes réversibles, l'effet de l'addition d'hydrolysat de caséine au milieu de postincubation pourrait être quelconque, mais l'incubation en présence de chloramphénicol devrait avoir pour effet de diminuer la fréquence des mutants induits, or il n'en est rien : il ne semble donc pas que le peroxyde produise des lésions qui soient à la fois d'emblée mutagènes et réversibles spontanément.

b) Lésion "prémutagène" évoluant spontanément vers la formation d'une lésion mutagène stable.

Si la lésion initiale est une lésion "prémutagène", évoluant spontanément vers la formation d'une lésion mutagène stable, le nombre final de bactéries mutées sera toujours le même, que la synthèse d'ADN soit lente ou rapide, cependant une synthèse rapide d'ADN pourrait provoquer une diminution de la fréquence des mutants induits détectés si ceux-ci sont sensibles à un effet de densité de population. En effet, dans ce cas, si le génotype muté est établi après une ou plusieurs divisions de la population bactérienne, les chances d'expression phénotypiques des mutants induits diminuent. Au contraire, si la synthèse d'ADN est très ralentie et que le génotype muté est établi avant la première division de la population bactérienne, les mutants induits auront le maximum de chance d'expression phénotypique.

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de l'effet d'une postincubation en présence de CM sur l'induction des mutants Pro^+ pourraient être compatibles avec une telle interprétation puisque nous avons établi que ces mutants sont sensibles à la pression de population. Par contre, les résultats obtenus lors de l'étude de l'induction de la mutation réverse Try^- ne seraient pas compatibles avec cette interprétation puisque les mutants Try^+, dont la fréquence augmente après incubation en présence de CM, ne présentent qu'une sensibilité minime à la pression de population.

c) Lésion "prémutagène" pouvant soit être réversée, soit être transformée en lésion mutagène stable.

Dans cette alternative, on ne peut prévoir a priori, les conditions métaboliques favorables à la transformation en lésion mutagène stable ou à la réversion de la lésion prémutagène.

Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus peuvent s'interpréter suivant cette hypothèse, en admettant que le peroxyde agit en produisant sur l'ADN des lésions prémutagènes dont la transformation en lésions mutagènes stables est favorisée par les conditions métaboliques crées par la postincubation en présence de CM, alors que les conditions métaboliques créees par la présence d'HC dans le milieu de postincubation auraient pour effet de favoriser la réversion des lésions prémutagènes.

Les données que nous avons obtenues sur l'action chimique spécifique du peroxyde succinique sur deux des désoxynucléotides (voir chap. V) dans des conditions qui se rapprochent de celles utilisées in vivo, étayent cette hypothèse : l'étape prémutagène pourrait être la transformation d'adénine de l'ADN en adénine 1 Noxyde, ou de cytosine de l'ADN en cyctosine 1 N oxyde. Si la spécificité d'appariement de ces deux dérivés de bases dans l'ADN, est la même que celle de la base originelle, cette transformation ne serait pas mutagène, mais si l'adénine 1 N oxyde est susceptible d'être transformée "in vivo" en hypoxanthine et la cytosine 1 N oxyde en uracile, cette transformation constituerait un évènement mutagène puisque l'appariement de ces deux composés est différent de ceux de l'adénine et de la cytosine ; au contraire, la réversion des 1 N oxydes vers la base originelle constituerait la réversion de la lésion prémutagène. Dans le cas de l'adénine 1 N oxyde, on a des raisons de penser que cette réversion pourrait avoir lieu in vivo par un processus enzymatique (FREDERIKSEN et KLENOW, 1960, et nos résultats chap. V). Ceci pourrait expliquer pourquoi le milieu 1 qui favorise une reprise plus rapide de la synthèse protéique, provoque une diminution de la fréquence des mutants induits. On n'a pas à l'heure actuelle de preuve de la possibilité de

transformation in vivo des adénines 1 N oxyde et cytosine 1 N oxyde en hypoxanthine et uracile respectivement, toutefois, certaines données obtenues par SCHWEITZ semblent indiquer que ces transformations sont possibles in vitro (H. SCHWEITZ, communication personnelle). On peut également envisager que si la spécificité d'appariements des 1 N oxydes est la même que celles des bases qui leur ont donné naissance, cette transformation en 1 N oxyde est à l'origine d'erreurs d'appariements plus fréquentes que celles que l'on considère comme étant responsables des mutations spontanées (WATSON et CRICK, 1953). Dans cette alternative, c'est l'erreur d'appariement qui constitue l'événement mutagène, et la transformation en 1 N oxyde constitue l'événement prémutagène dont la réversibilité ramène la probabilité de mutation d'un site donné à la probabilité de mutations spontanée.

RESUME ET CONCLUSIONS

Nous avons étudié les capacités biosynthétiques de bactéries traitées par le peroxyde succinique puis soumises à différents posttraitements.

Nous avons ainsi pu montrer que :

1/ La biosynthèse de l'ADN est moins perturbée que celles de l'ARN et les protéines.

2/ L'incubation en présence d'hydrolysat de caséine permet une reprise plus rapide qu'en milieu synthétique des diverses biosynthéses, en particulier de celle de l'ADN et des constituants nucléotidiques du pool acido-soluble.

3/ L'incubation en présence de chloramphénicol suivie d'une incubation en milieu synthétique ralentit particulièrement le taux de la synthèse de l'ADN et celui des composés nucléotidiques du pool acido-soluble.

Nous avons discuté ces différents résultats en relation avec les effets de ces différents milieux sur la fréquence des mutations induites par le peroxyde succinique et nous avons été amenés à conclure que le peroxyde produit vraisemblablement sur l'ADN des lésions "prémutagènes" susceptibles soit de réverser, soit d'évoluer vers la formation de lésions mutagènes stables.

Nous avons ensuite discuté la nature de telles modifications des bases de l'ADN par le peroxyde succinique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Etudiant l'action mutagène de trois peroxydes organiques, le peroxyde succinique, le peroxyde de cumène, le peroxyde de thymine, nous avons montré que ces peroxydes ont une action mutagène spécifique, c'est-à-dire qu'ils affectent différemment, différents sites d'un même génome.

Nous avons entrepris de déterminer l'origine de la spécificité de l'un d'entre eux, le peroxyde succinique.

Dans ce but, nous avons cherché à préciser le mécanisme de son action mutagène in vivo. Nous avons examiné la possibilité que son action mutagène soit de type indirect. Dans cette hypothèse, le peroxyde serait mutagène parce qu'il produirait in vivo des précurseurs modifiés des acides nucléiques qui seraient ensuite susceptibles d'être incorporés dans l'ADN et de provoquer des erreurs d'appariements aboutissant à la formation de nouvelles séquences de bases.

Nous avons réalisé un certain nombre d'expériences afin de vérifier cette hypothèse, mais tous les essais tentés dans cette voie se sont révélés négatifs. Nous en avons conclu que le peroxyde produit vraisemblablement son effet mutagène par une action directe au niveau de l'ADN intracellulaire.

Nous avons cherché à vérifier expérimentalement cette possibilité et nous avons pu montrer que l'ADN transformant d'Hemophilus Influenzae était susceptible d'être inactivé in vivo par le peroxyde succinique. Ces résultats étayent donc l'hypothèse d'une action mutagène directe du peroxyde succinique.

Bien que l'étude de son action chimique sur l'ADN in vitro ait été entreprise au laboratoire par H. SCHWEITZ qui a montré qu'il agit essentiellement sur les bases sans cliver les liaisons phosphoesters de l'ADN, la connaissance des modifications chimiques de l'ADN in vitro ne peut rendre compte que partiellement de la spécificité d'action mutagène de cet agent in vivo. Il ne faut pas oublier que les conditions métaboliques qui prévalent lors de l'application d'un agent mutagène à une cellule sont susceptibles d'influencer, soit le mécanisme même de l'action de cet agent, soit les modalités de l'expression phénotypique des mutants qu'il induit : ceci peut se traduire par une efficacité d'action accrue ou amoindrie selon les cas et faire apparaître une spécificité d'action mutagène, qui ne serait pas à mettre en rapport avec une spécificité d'action chimique de l'agent considéré sur l'ADN ou ses précurseurs, mais qui serait déterminée par les modalités de l'expression phénotypique des mutations induites.

C'est pourquoi, lorsqu'on recherche les causes de l'action mutagène de certains agents, il importe d'une part d'étudier leur action mutagène dans des

conditions métaboliques variables, et d'autre part, de comparer les effets de plusieurs d'entre eux dans des conditions métaboliques identiques, afin de déterminer la part qui dans l'intensité de l'effet mutagène que l'on mesure est d'origine physiologique et celle qui est liée au processus même de l'induction des mutations par ces agents.

Ces considérations nous ont conduit à étudier l'effet mutagène du peroxyde succinique lorsque les bactéries traitées sont placées dans différentes conditions métaboliques. Nous avons ensuite comparé l'effet mutagène des rayons U. V. sur des bactéries placées dans les mêmes conditions que celles traitées par le peroxyde succinique.

Cette comparaison a montré que la spécificité d'action observée dans le cas du peroxyde succinique est bien liée au processus de l'induction des mutations par cet agent et non à des effets au niveau de l'expression phénotypique des mutants induits.

Cette étude a montré en outre que le mécanisme de l'action mutagène du peroxyde succinique est bien différent de celui des rayons U. V. :

1/ Il semble que l'induction des mutations par le peroxyde succinique ne nécessite pas de synthèse protéique précoce, à l'encontre de ce que l'on observe dans le cas des rayons U. V. pour certaines classes de mutations.

2/ La similarité des conditions métaboliques favorables à l'apparition des deux mutations réverses dont nous avons étudié l'induction par le peroxyde succinique suggère que leur processus d'induction par le peroxyde est similaire dans les deux cas ; au contraire, l'établissement de ces mêmes mutations après l'action des U. V. est influencée de manière très différente par les mêmes conditions métaboliques, ce qui semble indiquer l'existence de processus d'induction différents pour ces deux mutations.

Nous avons ensuite étudié les capacités biosynthétiques de bactéries peroxydées, puis placées dans les diverses conditions métaboliques dont nous avions étudié les effets sur l'intensité de l'action mutagène du peroxyde succinique. Les résultats que nous avons obtenus indiquent que vraisemblablement le peroxyde succinique produit son effet mutagène en provoquant la formation sur l'ADN de lésions prémutagènes qui peuvent, soit être réversées, soit être transformées lésions mutagènes.

Tout modèle du mécanisme de l'action mutagène du peroxyde succinique, doit tenir compte des observations que nous avons faites et qui montrent que les lésions produites par le peroxyde succinique sont susceptibles d'évoluer.

Nous proposons donc un modèle du mécanisme de l'action mutagène du peroxyde succinique qui tient compte à la fois des résultats de peroxydation que nous avons obtenus in vitro avec les nucléotides, et des différents effets que nous avons observés in vivo. Ce modèle encore rudimentaire représente une tentative pour donner à nos résultats un maximum de cohérence et demande évidemment à être précisé.

Etant donné que, in vitro, le peroxyde succinique oxyde *sélectivement* l'acide désoxyadénylique en adénine 1 N oxyde, et l'acide désoxycytidilique en acide désoxycytidilique 1 N oxyde, (voir chapitre V), on peut penser que les dérivés 1 N oxyde des bases produits directement à partir de l'adénine et de la cytosine de l'ADN représentent le type de lésions prémutagènes que provoque l'action du peroxyde. Les dérivés 1 N oxyde non mutagène par eux même pourraient, comme cela semble être possible dans le cas de l'adénine

1 N oxyde, soit se retransformer en la base originale, soit se transformer en dérivé mutagène, c'est-à-dire en dérivé présentant une spécificité d'appariement différente de celle des bases initialement présentes.

La vérification de ce modèle est maintenant expérimentalement abordable d'une part grâce à la mise au point récente de méthodes d'isolement et d'identification de ces dérivés que l'on peut rechercher sur des échantillons d'ADN extraits de bactéries peroxydées, d'autre part grâce à l'étude de la spécificité d'appariement des 1 N oxydes que l'on peut obtenir avec un bon rendement sur les polynucléotides synthétiques.

BIBLIOGRAPHIE

ALTENBURG LS, 1954 - Proc. Nat. Acad. Sci., *40*, 1037-1040.

AUERBACH C. et ROBSON J., 1946 - Nature, *137*, 302.

BARKER C. R. et HIGHNETT R. C., JACKSON M. et WACKSWORTH M. J., 1961 - J. B. C. *78*, 429.

BAUTZ-FREESE E., 1961 - Proc. Nat. Acac. Sci., *47*, 540-545.

BENZER S. et CHAMPE S. P., 1962 - Proc. Nat. Acad. Sci., *48*, 1114-1121.

BENZER S. et FREESE E., 1958 - Proc. Nat. Acad. Sci. *44*, 112-119.

BRENNER S., BARNETT L., CRICK F. H. G. et ORGEL A., 1961 - J. Mol. Biol. *3*, 121.

BROOK T. D., 1961 - Annal Review of Microb. vol. *25*, 32-48.

BRYSON V., 1948 - J. of Bact. *56*-423.

CERIOTTI G., 1955 - J. Biol. Chem., *214*, 59.

CHEVALLIER M. R. et LUZZATI D. - C. R. *50*, 1572-1574.

CHEVALLIER M. R., SCHWEITZ H. et LUZZATI D., 1959 - C. R., *248*, 2413.

CLARKE G., 1963 - J. Gen. Microbiology, *31*, 353-363.

CRAMER F., RANDERATH K. et SCHAFER E. A. - BBA, *72*, 150-156.

CRAMER F. et SEIDEL H., BBA 1963 - *72*, 157-161.

CRAWFORD T. P. et YANOFSKY C., 1959 - Proc. Nat. Acad. Sci. *45*, 1280.

COHEN S. et BARNER H. D., 1954 - Proc. Nat. Acad. Sci. *40*, 885-893.

DAVIS B. D. et MINGIOLI, J. - Bact. 1950, *60*, 17.

DE DEKKEN, GRENSON M. et DE DEKKEN R. H. - BBA. - 1959, *31* , 195.

DEMEREC M., 1951 - Genetics, *36*, 385.

DEMEREC M., 1953 - Symp. Soc. Exptl Biol., *7*, 44.

DEMEREC M., 1960 - Proc. Nat. Acad. Sci., USA., *46*, 1075.

DEMEREC G., BERTANI et J. FLINT, 1951 - Am. Naturalist. *85*, 119-136.

DEMEREC M. et CAHN E., 1953 - J. of Bact. *67*, 27-36.

DEMEREC M. et LATARJET R., 1946 - Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biology, *11*, 38-50.

DICKEY F. H. et CLELAND J. H. et LOTZ C., 1949 - Proc. Nat. Ac. Sci. *35*, 581-595.

DISCHE Z., 1955 - J. Biol. Chem. *214*, 59.

DISCHE Z. - In Nucleic Acids, Academic Press.

DOUDNEY C. O. et HAAS F. L., 1960 - Genetics *45*, 1481-1502.

DOUDNEY C. O. et HAAS F. L., 1957 - Proc. Nat. Acad. Sci., *43*, 871-883.

DUNN D. E. et SMITH J. D., 1954 - Nature *174*, 305.

EKERT B. et MONNIER R. - Ann. Inst. Pasteur 1957, *92*, 556.

FRANZEN J. S. et BINKLEY S. B. - J. Biol. Chem. *236*, 515.

FREDERIKSEN et H. KLENOW, 1960 - BBRC, *2*, 329-332.

FREESE E., 1959 - a) Proc. Nat. Acad. Sci. *45*, 622-633.

FREESE E., 1959 - b) J. Mol. Biol. *1*, 87-105.

GAREN A. et SIDDIQI, 1962 - Proc. Nat. Acad., *48*, 1121-1127.

GIERER A. et MUNDRY K., 1958 - Nature *182*, 1457.

GILLIES N. E. et ALPER T., 1960 - BBA, *43*, 182.

GLOVER S. W., 1956 - Genetics Studies with Bacteria, 121-136.

GOLDSTEIN D. B. et BROWN A., 1960 - BBA, *43*, 55.

GRIGG G. W., 1959 - Astral. J. Biol. Sci., *11*, 69.

HAROLD F. M. et ZIPORIN Z. Z., 1958 - BBA, *28*, 482-491.

HAROLD F. M. et ZIPORIN Z. Z., 1959 - BBA, *29*, 439-440.

HAYES W., 1957 - J. Gen. Microb. *16*, 91-97.

HILL R. F. et SIMPSON, 1961 - J. Gen. Microb. *24*, 1.

JACOB F. et MONOD, 1961 - J. Mol. Biol. *3*, 318.

JACOB F. et WOLLMAN E. L., 1961 - Sexuality and the Genetics of Bacteria, p. 374.

KADA T., BRUN E., et MARCOWICH H., 1960 - Ann. Inst. Pasteur, *99*, 547-566.

KELNER A., 1949 - J. of Bact. *58*, 511-522.

KELNER A., 1953 - J. of Bact. *65*, 252-262.

KELLENBERGER G., ZICHICHI et WEIGLE J., 1961 - Proc. Nat. Ac. Sci. Wash. *47*, 869.

KIRCHNER L. W. J., 1960 - J. Mol. Biol. *2*, 331.

KLENOW H., 1959 - BBA, *35*, 412.

KORNBERG, 1958 - Chemical basis of Heredity.

LARK, 1960 - BBA, *45*, 121-133.

LATARJET R. et REBEYROTTE N., 1958 - Peroxydes organiques en radiobiologie, Masson Ed.

LATARJET R., 1956 - Ciba, Symp. on Ionizing Radiations and Cells metabolisms 275-297.

LATARJET R., EKERT B., APELGOTS, REBEYROTTE N., 1961 - J. Chimie Phys. *58*, 1046-1048.

LATARJET R., MORENNE P. et BERGER - Ann. Inst. Pasteur, 1953, *85*, 174.

LATARJET R., EKERT B., DEMERSEMAN P., 1963 - Radiat. Research, Suppl. *3*, 247-256.

LAWLEY P. D., 1961 - a) J. Chimie physique.

LAWLEY P. D., 1961 - b) Biochem. Journal, *78*.

LEDERBERG J., 1951 - J. of Bact. *61*, 549-550.

LERMAN L. S., 1961 - *3*, 16-20, J. of Mol. Biol.

LERMAN L. S., LUZZATI V. et MASSON F., 1961 - J. Mol. Biol. *3*, 634-639.

LICHTENSTEIN, BARNER et COHEN, 1960 - JBC, *253*, 457.

LOVELESS A., 1951 - Nature, *167*, 338-342.

LORKIEWICZ Z. et SZYBALSKY W., 1961 - J. of Bact. *82*, 195.

LUZZATI D., 1959 - non publié.

LUZZATI D. et CHEVALLIER M. R., 1957 - Ann. Inst. Pasteur *95*, 365.

LUZZATI D., SCHWEITZ H., BACH M. L. et CHEVALLIER M. R., 1961 - J. de chim. Phys.

MAE O. et HANAVALT, 1961 - J. of Mol. Biol. *3*, 144.

MARJOLIN P. et MUKAI F. H., 1961 - Z. fur Vererbungslehre, *92*, 330.

MARTIN J. B. et DOTY D. M., 1949 - Analyt. Chem. Wash. *21*.

NOVICK A. et SZILARD L., 1952 - Nature, *170*, 926.

NEWCOMB H. B. et SCOTT G. W., 1949 - Genetics, *34*, 475-492.

OKAGAKI H., 1959 - J. Bact. *79*, 277-291.

Peroxydes organiques en radiologie, Ed. Masson, 1958.

PRUSOFF A. W. H., 1959 - Biochem. Pharmacol., *2*, 221.

RAPOPORT, 1946 - C. R. Acad. Sci., URSS, N. S. *54*, 65-67.

RAPOPORT, 1948 - Dokl. Akad. Nand. SSSR., NS *60*, 469-472.

ROBERTS et coll., 1957 - dans Studies of Biosynthesis in E. Coli Acidosoluble Ch. 2, 13-30 C.

Phosphore des Lipides, p. 16. Utilisation des nucléosides et des exogènes, p. 108.

RUBIN A., 1954 - Genetics *36*, 296-306.

RUDNER, 1960 - BBRC, *3*, 275.

RUPPERT G. S., 1960 - J. Cen. Physiol. *43*, 574.

RUPPERT G. S., GOODGAL S. H. et HERRIOTT R. M., 1958 - J. Gen. Microb. *41*, 451.

RYAN F. J., 1959 - J. Gen. Microb. *21*, 530.

RYAN F. J., WAINWHRIGHT L. K., 1954 - J. Gen. Microb. *11*, 364.

RYAN F. J., FRIED R. et SCHWARTZ M. S., 1954 - J. Gen. Microb., *11*, 380.

RYAN F. J., OKADA T. et NAGATA T., 1963 - J. Gen. Microb., 103.

SCHNEIDER W. C., 1945 - J. Biol. Chem., *161*, 295.

SCHOLES G. et J. WEISS et WHEELER C. M., 1956 - Nature, *178*, 157.

SCHOLES G. et WEISS J., 1954 - Biochem. Journal *56*.

SCHOLES G. et WEISS J., 1960 - Nature *185*, 305-306.

SCHOLES G., WARD J. F. et WEISS J., 1960 - J. Mol. Biol? *2*, 379-391.

SCHWEITZ H. - Communication personnelle.

STEVENS et coll., 1958 - J. Biol. Chem. *233*, 1513.

STEVENS M. A. et SMITH H. W. et BROWN G. B., 1959 - Ann. Chem. Soc., *81*, 1734.

STRAUSS B. S., 1962 - J. Theoret. Biol. *2*, 266-278.

STRAUSS B. S. et OKUBO, 1960 - J. of Bact. *79*, 464.

STONE W., WYSS O. et HAAS F., 1946 - Proc. Nat. Acad. Sci., *33*, 59-60.

STREZLOFF E., 1961 - BBRC., 384.

STUY J., 1962 - J. Photochem. Photobiol. *1*, 40.

STUY J. - Thèse Utrecht, 1961.

SUSKIND S. R. et KUREK J. - Proc. Nat. Ac. Sci. 1959, *45*, 193.

SZYBALSKI W., 1959 - Developments in Industral Microbiol. Plenum Press, New-York, 1960, p. 231-241.

TERZACHI B. E., STREISINGER G. et STAHL F. W., 1962 - Proc. Nat. Ac. Sci. *48*, 1519-1524.

UPDEGRAFF D. M. et BOVEY F. A., 1958 - Nature, *181*, 890-893.

VIELMETTER W. et SCHUSTER H., 1960 - Z. f. Naturforsch. 15b, 304-311.

VOLL M. et GOODGAL S. H., 1961 - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *47*, 505.

WANG T. P. - Dans Methods in Enzymology, tome II p. 478 (955).

WATSON J. D. et CRICK F. H. C., 1953 - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *18*, 123-131.

WITKIN E. M., 1956 - Cold Spring Harbon Symposia on Quant. Biology.

WITKIN E. M. et THEIL E. - Proc. Nat. Ac. Sci. 1960, *46*, 226-231.

WYSS O., CLARK J. B., HAAS J. B., STONE W. S. - J. Bact. *56*, 51-57, 1948.

WYSS O., HAAS F., CLARK J. B. et STONE W. S., 1950 - J. Cell. Comp. Phys. 35, supp. 1, p. 133.

WYSS O., STONE W. S., CLARK J. B. - J. Bact. *54*, 767-772, 1947.

YURA T., 1956 - Genetic Studies with Bacteria 77-86.

ZAMENHOF S. et GRIBOF F. G., 1954. Nature *174*, 305.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

"INTERACTIONS DE L'ADN AVEC LES COLORANTS"

Strasbourg, le 22 avril 1964
Le Président de thèse
Charles SADRON

Vu :
Strasbourg, le 22 avril 1964
p. le Doyen
le Professeur délégué
J.H. VIVIEN

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 24 avril 1964
Le Recteur de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université
J.F. ANGELLOZ.

IMP. LOUIS-JEAN – GAP
Dépôt légal n° 18 – 1965